

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Física Aplicada**



**TESIS DOCTORAL**

**DESARROLLO DE UN QUESO DE CABRA ENRIQUECIDO DE  
MANERA NATURAL EN OMEGA-3 Y ÁCIDO LINOLEICO  
CONJUGADO. ENSAYO CLÍNICO EN VOLUNTARIOS CON  
SOBREPESO Y OBESIDAD**

**CRISTINA SANTURINO FONTECHA**



**Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación  
(CIAL, CSIC-UAM)**

**Madrid, Julio 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Física Aplicada**



**DESARROLLO DE UN QUESO DE CABRA ENRIQUECIDO DE MANERA  
NATURAL EN OMEGA-3 Y ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.  
ENSAYO CLÍNICO EN VOLUNTARIOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD**



Memoria presentada por

**CRISTINA SANTURINO FONTECHA**

Para optar al grado de:

**Doctor en Ciencias de la Alimentación**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

**Dr. Fco. Javier Fontecha Alonso**

**Dra. Carmen Gómez Candela**

**FRANCISCO JAVIER FONTECHA ALONSO, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN Y CARMEN GÓMEZ CANDELA, DOCTORA EN MEDICINA, JEFA DE LA UNIDAD DE NUTRICIÓN CLÍNICA Y DIETÉTICA DEL SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ E INVESTIGADORA CIENTÍFICA EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN IDIPAZ**

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado: “Desarrollo de un queso de cabra enriquecido de manera natural en omega-3 y ácido linoleico conjugado. Ensayo clínico en voluntarios con sobrepeso y obesidad”, que constituye la memoria que presenta Cristina Santurino Fontecha, ha sido realizado en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, instituto mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad Autónoma de Madrid, bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid y, por lo tanto, autorizamos su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente Certificado en Madrid, a 26 de junio de 2017.

Fco Javier Fontecha Alonso

Carmen Gómez Candela

Este trabajo ha sido realizado en el marco del siguiente proyecto:

- Proyecto CDTI-20130574. “Desarrollo de queso de cabra con óptimo índice aterogénico con propiedades funcionales probadas mediante estudios clínicos de intervención dietética”.



*“Life is for participating, not for spectating”*

Kathrine Switzer

## Agradecimientos

Según la Real Academia Española, el maratón es 'una carrera de resistencia en la que se recorre la distancia de 42 km y 195 metros', por ser la distancia que recorrió, desde la localidad con el mismo nombre hasta Atenas, un soldado griego en el año 490 a.C., para anunciar la victoria sobre los persas.

Y como todos los maratones, éste empezó mucho antes del disparo de salida.

Mi largo camino como maratoniana empezó, hace ya cinco años, entre nutrición e investigación en el Hospital de La Paz. Allí, entre la ignorancia y la ilusión me encontré con Carmen. Gracias por haberme dado la oportunidad de empezar, por haber confiado en mi y por haberme transmitido tanto, como persona y como profesional. Recuerdo los años en La Paz como un entrenamiento de técnica de carrera con zapatillas nuevas, de esos de los que absorbes como una esponja y te dejas llevar. En esa preparación me crucé con gente maravillosa de la que aprendí mucho y con la que me reí aún más: Marina, gracias por tu amistad, tu vitalidad, tu humanidad, por escuchar, por tu sonrisa y por tus ganas de aprender; Marlhyn, gracias por todos los buenos momentos y por enseñarme que para ser fuerte sólo hay que proponérselo y luchar. Gracias Bricia por estar y por tu firmeza; gracias Laura, por tu buena energía; gracias Nines, por cuidarme tanto; y gracias a todas aquellas personas de la Unidad de Nutrición que formaron parte de ese entrenamiento. Sois un gran equipo y hacéis una gran labor.

Con las zapatillas bien atadas y la técnica de carrera aprendida, me fui al CIAL a empezar el plan de entrenamiento entre pipetas, cromatógrafos, quesos, plasmas, eritrocitos y lípidos. En el CIAL entrené las tiradas largas en primavera, pero también hice series en invierno y sufrí las cuestas los días en los que el viento no me dejaba avanzar. Gracias Javi, por darme la oportunidad de crecer como científica, por dejarme descubrir y disfrutar de una de mis grandes pasiones, por el aprendizaje y la formación, por transmitirme tu sabiduría y tu ilusión por la ciencia. Gracias Mariví, por tu paciencia y tu cariño, por ayudarme a crecer también como persona, por tu buena disposición, y por cuidarme con la ternura y el cariño de una madre. Gracias por dejarme formar parte de este bonito proyecto. Gracias a los dos por hacerme sentir como en casa.

Gracias Manuela, eres y serás siempre un ejemplo de pasión maratoniana para mí. Gracias Juanita, por tus consejos, tus llamadas y tu afecto. Gracias Juan Carlos y Alfonso, sin vosotros esto tampoco hubiera sido posible.

Después de muchas salidas de madrugada, amaneceres, 5K, lluvia, mancuernas, plátanos, atardeceres, brócoli, canciones, sol, lavadoras, música, 10K, fisioterapia (y alguna otra terapia), 20K, arroz, medios maratones, pollo, 25K, geles de glucosa y 30K, llegó el día del Maratón de mi Tesis. Maratón y Tesis en mayúscula, porque ni una ni la otra se consiguen todos los días. Madre mía, ni mucho menos.

En el cajón de salida estaban Alba y Pilar. Gracias Alba, no sólo por acompañarme de la mano en este camino, sino por ser fundamental. Gracias por enseñarme tanto, por los billones (¡como mínimo!) de buenos momentos que hemos vivido, por todos los ataques de risa, por tu bondad, por las lágrimas compartidas, por Santander y sus helados, por cuando nos bajamos de la vida, por todos los cafés y chocolates, por nuestras tonterías, por Vetusta y por compartir deriva. Gracias Pilar, por tu paz y tu calma, por tu gran corazón, por no juzgar, por tus consejos, por enseñarme de ciencia y de gatos, por tu comprensión, por los selfies trucados, y por entenderme sin hablar. Gracias por tanto a las dos, por los abrazotes cachalotes, gracias por estar siempre y ser los mejores años de mi vida. Y los que nos quedan.

#### *Pum* (pistoletazo de salida)

Para correr un maratón no sólo he necesitado las piernas. He tenido que tirar de cabeza y de corazón, mucho corazón. Muchos libros y blogs de corredores me recomendaron mucha calma durante los primeros kilómetros. Fue ahí, en el cajón de salida, cuando me encontré con muchas caras sonrientes que me acompañaron durante unos metros. Gracias a todas esas personas que han hecho el camino más fácil. Gracias a los primeros avituallamientos, imprescindibles para mantener una buena hidratación: a Pila por tu paz y nuestro chicún; a Tomás por los buenos consejos y ese vídeo de muffins-acné; a Marta por los chutes de helio en aquella fiesta de Navidad; a Dani por tu azúcar enchilado y tu buena vibra pinche wey; a Elvi por tus probióticos de la felicidad; a Natalia por tus llamadas y tus abrazos; a Pablo por tu moreno envidiable; a Carlos por tus mensajes de madrugada; a Dani por tu pelo en el pecho; a Loreto por dejarnos tu abono transporte (fue un antes y un después en mi vida); a Eva por tu esencia; a Mariuca por tus dotes de montañismo, a Javi, a Elena, a Latifa, a JJ, a Nerea, a Dani, a Laura, a Lidia, a Javi Zubieta, a Jose de mantenimiento, a Macarena, a Julia, a Gloria, a David, a Tere, a Lourdes, a Ana Belén, a Conchi, a Tiziana y a Josefina. Gracias a todos los que me regalasteis una sonrisa en el atrio, en los pasillos, entre los microondas, en la fuente, en el bus y en las escaleras. Gracias a vosotros el camino fue más ameno y divertido durante aquellos primeros pasos.

Los primeros kilómetros fueron pasando entre algodones, con la facilidad de estar haciendo lo que de verdad te gusta y la sensación de estar en el momento y en el lugar adecuado. Detrás de esa firmeza invulnerable había mucho asfalto pisado a golpe de zapatilla, muchos dorsales, cromatogramas, parques, diclorometano y muchos minutos de sonicación (así me he quedado).

Cuando pasé el arco que indicaba que ya había dejado atrás los primeros 21 km y 97 metros, me sumergí en las sonrisas y en los abrazos de todas aquellas personas que todavía siguen sin saber que es lo que hago exactamente con los quesos. Gracias Jelen, mi *sparring*, por tu apoyo incondicional, por tu transparencia y los entrenamientos de las 7 am, por las risas y los llantos, y por nuestros cafés con *croisancito* para arreglar el mundo; Anayé, gracias por tu apoyo incondicional. Gracias Iván por creer en mí y por hacerme bailar, que lo tuyo te ha costado. Gracias Gonzi, Isa, Jacqui, Manu, Guille. Gracias a todos por las clases, las sonrisas, y los retos compartidos. Gracias por hacer del gimnasio un hogar lleno de buenos momentos, gracias por ser los *tap here to power up* cada tarde.

Oh, ¡no!

No recuerdo en qué punto las piernas me empezaron a pesar y tuve miedo de encontrarme con el famoso 'muro' del kilómetro 30. En el 'muro' se terminan las reservas de glucógeno muscular, y el cuerpo debe empezar a utilizar rutas más complicadas y menos eficientes, menos cómodas y por lo tanto, más costosas. Todas las ganas con las que empezaste pueden terminarse, la motivación se desvanece y las piernas no responden. A partir de aquí sólo es posible continuar corriendo con la cabeza y con el corazón. Y perdonad que os diga, pero de amor me siento plena.

Gracias Ruth, por encontrarme y darme alas, por tus abrazos de verdad y tu amor infinito a la vida y a las personas. Gi, gracias por ser incondicional. Berto, gracias por tu pureza y tus palillos mentolados. Julia, gracias por estar y preocuparte siempre. Sergio, gracias por transmitirme tu bondad. Gracias Juanki, Mariete, Pablo. Gracias a mis *runners* por lo conseguido el 23 de abril, por #hastaluegoMariCarmen, por venir a alegrarme la vida todas las semanas.

A partir del kilómetro 35 fue un viaje complicado y largo. En ese avituallamiento me empapé de Vetusta, de Izal, de Zahara, de Bon Iver, de Carlos Sadness, de Manel, de Tom Rosenthal, de Carmen, de Oasis, de Nunatak, de Belize, de Delafé, de Jarabe de Palo, de Love of Lesbian, de Dorian, de The xx, y hasta de Raffaella Carrà. Me calé de madrugones, de Ángel,

de mis vecinos, de los cafés en Casa Aurelio, de la Dehesa de la Villa, de Spotify pero no de Netflix; de Izi y de su manera de acurrucarse a mi lado sólo cuando le apetece, que siempre es cuando más lo necesito; y de aquellas personas que ya no están tan cerca pero sí lo está su esencia: gracias Cris, Lara, Giu, Parras y Helen. Y gracias a todos los que nunca os cansasteis de preguntarme por la Tesis ni cuando ya estaba cansada de responder.

Para poder llegar a la meta tuve que reducir la distancia de zancada, bajar el ritmo, controlar pulsaciones y pedir ayuda y aplausos a las personas que nunca han esperado que lo hiciera porque siempre han estado, las que nunca fallan, las de verdad. Sergio, gracias por mantenerme en calma en la distancia y gracias por tu comprensión, gracias por aquellas primeras Nike, gracias por tu buen sentido del humor. Esther, gràcies per la teva força, la teva comprensió y les teves ganes de viure. Oriol y Sira, gracias por vuestras sonrisas y por vuestra inocencia, por renovarme la ilusión en Navidad. Carlos, gracias por enseñarme a correr, por tu fuerza de voluntad ante cualquier adversidad. Gracias Ana, Javi, Carol.

Abuelo, gracias por tu apoyo incondicional y por tu serenidad, gracias por enseñarme a que a veces no hay que hablar para decir mucho. Abuela, gracias por tu ilusión por la vida y por tu amor. Joder, gracias de corazón por acompañarme en este camino desde antes de empezar a andar. Gracias por aquellos partidos de palas en la playa, por tus ataques de risa tan contagiosos, por tu energía incombustible y eterna.

Gracias por llevarme hasta esta meta de la mano. No tengo palabras para describir lo que significáis para mí.

Gracias tía Esther, Miguel, Encarna, por existir.

Antes de cruzar la meta sólo corres con el corazón. Es aquí, en este momento, cuando me siento feliz por haber llegado hasta aquí y por haberlo conseguido. Y es aquí cuando me encuentro con mis dos pilares fundamentales, con mi espina dorsal. Gracias Patri, por luchar por tus sueños y por enseñarme a hacerlo, por estar cerca aún estando lejos, por ser completamente incondicional y por acompañarme en este viaje y en todos los de mi vida. Gracias por transmitirme la pasión por lo que haces, por tus mensajes, por tus llamadas, por entenderme, por nuestras guerras de cojines, por nuestras carreras por casa.

Gracias mamá. Gracias. Porque sin ti no hubiera cruzado ni esta meta ni ninguna. Gracias por quererme, ayudarme, escucharme, enseñarme a luchar, por tus abrazos. Gracias por las cenas, los paseos, los viajes y por el apoyo. Gracias, de corazón, por la vida que nos has

regalado, por los valores que nos has dado, por tu fuerza y tu entereza ante todo. Gracias por haber dedicado toda tu vida a cuidarnos y a querernos. Gracias, por quererme tal y como soy. Gracias por ser el arco de salida y de llegada.

Gracias a las dos por ser aquellos aplausos sin aliento cuando la carrera se acaba.

Gracias por ser los abrazos en la meta. Gracias por ser casa. Mi casa.

Es más que apasionante el momento en el que cruzas la meta, cuando el tiempo se para y un sueño se cumple. Gracias a los que se les paró el reloj antes de tiempo. Gracias tía Emma, sigues aquí. Y gracias papá, gracias por la vida, sé que estás y te conozco sin apenas haberlo hecho. Gracias por habernos dejado en las mejores manos del mundo.

Gracias por colgarme la medalla.

Gracias por formar parte del Maratón de mi Tesis.

Gracias a ti, por cruzar esta meta conmigo.

Gracias por ser mi vida.

Y ahora, si me permites, y después de una buena recuperación, voy a seguir cumpliendo sueños.

Os quiero con las piernas, con la cabeza y, por supuesto, con el corazón.

El mundo necesita gente que ame lo que hace.

Cris



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALA:** ácido alfa-linolénico

**AN:** grasa androide

**ApoA1:** apolipoproteína A1

**ApoB:** apolipoproteína B

**BMD:** densidad mineral ósea

**BMI:** índice de masa corporal

**BPC:** Buena Práctica Clínica

**CCi:** circunferencia de cintura

**CEIC:** Comité Ético de Investigación Clínica

**CHOL:** colesterol

**CI:** consentimiento informado de participación

**CLA:** ácido linoleico conjugado

**CRD:** cuaderno de recogida de datos

**CRP:** proteína C reactiva ultrasensible

**CVD:** enfermedades cardiovasculares

**CVR:** riesgo cardiovascular

**DHA:** ácido docosahexaenoico

**DM:** materia seca

**DPA:** ácido docosapentaenoico

**DXA:** absorciometría dual de rayos X

**EC:** ésteres de colesterol

**EPA:** ácido eicosapentaenoico

**EVA:** escala visual analógica

**FA:** ácidos grasos

**FAME:** ésteres metílicos de ácidos grasos

**FFA:** ácidos grasos libres



**GC:** cromatografía de gases

**GI:** grasa ginoide

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**HIP:** hoja de información al paciente

**HT:** hipertensión arterial

**IDL:** lipoproteínas de densidad intermedia

**IL-6:** interleucina-6

**IPAQ:** cuestionario internacional de actividad física

**LA:** ácido linoleico

**LCFA:** ácidos grasos de cadena larga

**LCTAG:** triglicéridos de cadena larga

**LDL-ox:** lipoproteínas de baja densidad oxidadas

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LM:** masa magra

**MCFA:** ácido grasos de cadena media

**MCTAG:** triglicéridos de cadena media

**MFGM:** membrana del glóbulo graso de la leche

**MUFA:** ácidos grasos monoinsaturados

**PA:** presión arterial

**PC:** fosfatidilcolina

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PI:** fosfatidilinositol

**PL:** lípidos polares

**PS:** fosfatidilserina

**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados

**QM:** quilomicrones

**R1:** rebaño de cabras seleccionado

**RA:** ácido ruménico

**REGICOR:** Registre Glroní del COR

**SCFA:** ácidos grasos de cadena corta

**SCTAG:** triglicéridos de cadena corta

**SD:** desviación estándar

**SFA:** ácidos grasos saturados

**SM:** esfingomielina

**TA:** tensión arterial

**TAG:** triglicéridos

**TFA:** ácidos grasos *trans*

**TFM:** masa grasa total

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TS:** sólidos totales

**TVA:** ácido vacénico

**UFA:** ácidos grasos insaturados

**VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. La importancia de la leche en la alimentación .....	3
1.2. La leche de cabra.....	4
1.2.1. Fracción lipídica de la leche de cabra y salud.....	5
1.2.2. Estrategias para mejorar el perfil lipídico de la leche .....	9
1.2.2.1. Modificación de la dieta de rumiantes .....	10
1.3. Los productos lácteos y su relación con las enfermedades cardiovasculares	13
1.3.1. Factores de riesgo cardiovascular.....	13
1.3.1.1. Factores de riesgo modificables.....	14
1.3.1.2. Factores de riesgo no modificables.....	15
1.4. Marcadores de riesgo cardiovascular.....	16
1.4.1. Marcadores lipídicos plasmáticos de riesgo cardiovascular.....	16
1.4.2. Marcadores plasmáticos de inflamación.....	19
1.4.3. Marcadores plasmáticos de ingesta.....	20
1.4.4. Nuevos biomarcadores “ómicos” .....	21
1.5. La grasa láctea y las enfermedades cardiovasculares.....	21
1.6. Alimentos lácteos funcionales y salud cardiovascular.....	23
 <b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>25</b>
 <b>3. ESTUDIO DE LA MEJORA NUTRICIONAL DEL PERFIL LIPÍDICO DE LA LECHE DE CABRA.....</b>	<b>31</b>
3.1. Introducción .....	33
3.2. Materiales y métodos.....	34
3.2.1. Selección de la explotación caprina participante en el estudio .....	34
3.2.2. Mejora de la calidad nutricional de la leche.....	34

3.2.2.1. Diseño de un concentrado que integre el suplemento Lodyn Milk <sup>®</sup> en su composición.....	34
3.2.2.2. Ensayo de suplementación realizado en el rebaño R1 .....	35
3.2.2.3. Composición físico-química.....	37
3.2.2.4. Extracción de la grasa de las muestras lácteas.....	37
3.2.2.5. Análisis de los ácidos grasos metil ésteres (FAME) de la fracción lipídica.....	37
3.2.2.6. Análisis estadístico.....	38
<b>3.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>38</b>
3.3.1. Selección de la explotación ganadera participante en el estudio .....	38
3.3.2. Mejora de la calidad nutricional del perfil lipídico de la leche de cabra. Ensayo de suplementación.....	41
3.3.2.1. Evolución de la ingesta del pienso por parte de las cabras .....	41
3.3.2.2. Evolución de la composición físico-química de la leche.....	42
3.3.2.3. Evolución del perfil lipídico de la leche .....	43
<b>3.4. Conclusiones parciales.....</b>	<b>47</b>
 <b>4. ELABORACIÓN DE UN QUESO DE CABRA ENRIQUECIDO DE MANERA NATURAL CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO .....</b>	<b>49</b>
4.1. Introducción .....	51
4.2. Materiales y métodos.....	52
4.2.1. Elaboración de queso .....	52
4.2.2. Almacenamiento en refrigeración/congelación.....	52
4.2.3. Composición del queso .....	52
4.2.4. Extracción lipídica .....	53
4.2.5. Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos.....	53
4.2.6. Análisis de triglicéridos y colesterol .....	54
4.2.7. Análisis de clases lipídicas por HPLC-Detector evaporativo de	

dispersión de luz (ELSD).....	54
4.2.8. Análisis del perfil de textura (TPA) .....	55
4.2.9. Evaluación sensorial .....	55
4.2.10. Análisis estadístico .....	56
<b>4.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>56</b>
4.3.1. Caracterización del queso .....	56
4.3.1.1. Composición físico-química y nutricional.....	56
4.3.1.2. Caracterización lipídica.....	56
4.3.1.3. Efecto del almacenamiento.....	61
4.3.1.4. Composición en triglicéridos y colesterol.....	64
4.3.1.5. Composición de clases lipídicas .....	67
4.3.1.6. Análisis instrumental de textura y evaluación sensorial del producto final.....	70
<b>4.4. Conclusiones parciales.....</b>	<b>72</b>
 <b>5. ENSAYO CLÍNICO EN VOLUNTARIOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1. ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO Y DETERMINACIÓN DE MARCADORES SANGUÍNEOS: LIPÍDICOS, INFLAMACIÓN Y SACIEDAD .....</b>	<b>77</b>
5.1.1. Introducción.....	79
5.1.2. Materiales y métodos .....	80
5.1.2.1. Descripción del estudio .....	80
5.1.2.2. Consideraciones generales .....	81
5.1.2.3. Selección de la población de estudio y tratamientos .....	81
5.1.2.4. Desarrollo del estudio.....	83
5.1.2.5. Recogida de muestras sanguíneas .....	86
5.1.2.6. Procedimiento de cumplimiento y notificación de acontecimientos adversos.....	87
5.1.2.7. Análisis estadístico.....	87

<b>5.1.3. Resultados y discusión .....</b>	<b>88</b>
5.1.3.1. Participantes .....	88
5.1.3.2. Características poblacionales, cumplimiento y acontecimientos adversos.....	89
5.1.3.3. Análisis evolutivo .....	90
5.1.3.3.1. Índice de Masa Corporal, circunferencia de cintura y presión arterial.....	90
5.1.3.3.2. Absorciometría de Rayos X de Energía Dual (DXA) .....	93
5.1.3.3.3. Hábitos dietéticos, actividad física y riesgo cardiovascular	93
5.1.3.3.4. Marcadores sanguíneos lipídicos .....	95
5.1.3.3.5. Marcadores sanguíneos de inflamación.....	100
5.1.3.3.6. Marcadores hormonales sanguíneos de saciedad.....	103
<b>5.1.4. Conclusiones parciales .....</b>	<b>105</b>
 <b>5.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EN PLASMA Y ERITROCITOS .....</b>	 <b>107</b>
5.2.1. Introducción.....	109
5.2.2. Materiales y métodos .....	110
5.2.2.1. Reactivos químicos .....	110
5.2.2.2. Muestras sanguíneas y análisis de extractos lipídicos.....	110
5.2.2.3. Análisis estadístico.....	112
5.2.3. Resultados y discusión .....	113
5.2.3.1. Composición en ácidos grasos de plasma y eritrocitos.....	113
5.2.3.2. Composición de grupos de triglicéridos por números de átomos de carbono en plasma y eritrocitos .....	130
5.2.3.3. Composición de clases lipídicas en plasma y eritrocitos.....	139
5.2.4. Conclusiones parciales .....	150

6. RESUMEN .....	151
7. CONCLUSIONES GENERALES .....	159
8. BIBLIOGRAFÍA .....	163

# 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1. IMPORTANCIA DE LA LECHE EN LA ALIMENTACIÓN

La leche y los productos lácteos han sido considerados, durante muchos años, esenciales para satisfacer los requerimientos nutricionales y son consumidos como parte de una dieta equilibrada gracias a su alto aporte nutricional, a su amplia gama de nutrientes y al elevado valor biológico de éstos. La leche está compuesta mayoritariamente por agua, carbohidratos, grasa, proteínas, vitaminas y minerales, manteniendo un buen balance entre sus componentes. Además, estudios recientes consideran que la leche es la fuente más importante de compuestos con actividad biológica de interés para la salud como el ácido linoleico conjugado (CLA) (Yerlikaya *et al.*, 2013; Juárez *et al.*, 2015; Hess *et al.*, 2016).

Sin embargo, este consenso sobre la importancia del consumo de los productos lácteos desaparece cuando nos referimos a la grasa láctea (Tunick *et al.*, 2015). Durante las últimas tres décadas, las recomendaciones dietéticas han utilizado erróneamente la premisa de que la grasa láctea es una fuente innecesaria de calorías y de grasa saturada en la dieta humana. Aunque los lípidos lácteos constituyen uno de los elementos más importantes de la leche y de los productos lácteos por las características organolépticas y físicas que les confiere, su ingesta se ha relacionado con un aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (CVD), que son la primera causa de mortalidad en el mundo (Fontecha & Juárez, 2012; OMS, 2016). Estas percepciones han ido evolucionando durante los últimos años debido a revisiones y metaanálisis en los que se concluye que no existe una asociación entre la ingesta de grasa láctea y un mayor riesgo de sufrir CVD (Perk *et al.*, 2012; Tunick *et al.*, 2015; Szajewska & Szajewski., 2016).

La grasa láctea representa la fuente de lípidos más compleja de la dieta humana y está compuesta por más de 400 ácidos grasos (FA) (de 4 a 26 átomos de carbono), aunque sólo 30 de ellos se encuentran en una concentración superior al 0.1% y el resto sólo están presentes en cantidad de trazas. Además, la grasa láctea está constituida aproximadamente por un 60-70% de ácidos grasos saturados (SFA), un 20-25% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) con un 20-22% de ácido oleico (*cis*-9 C18:1), un 1-4% de ácidos grasos *trans* (TFA) y un 2-5% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), en cuya fracción se encuentran el ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2, LA), el ácido  $\alpha$ -linolénico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3, ALA) y el CLA. La grasa láctea es, además, una de las fuentes de colesterol (CHOL) de nuestra dieta, con un contenido medio de 260 mg/100 g de grasa. Por otro lado, ésta representa un vehículo

indispensable para los compuestos del aroma, así como de las vitaminas liposolubles A, E, D y K.

En la leche, la grasa se encuentra en forma de glóbulos cuyo núcleo está constituido, en su mayoría, por triglicéridos (TAG) (>95%) rodeados por la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM). La MFGM es una tricapa lipídica única en la naturaleza compuesta mayoritariamente por un 70% de proteínas y un 30% de lípidos, de los que un 25% son lípidos polares (PL) (fosfo- y esfingolípidos), entre otros compuestos que también forman parte de la membrana (Castro-Gómez, 2015).

Los resultados de estudios científicos recientes han confirmado la presencia en grasa láctea de distintos compuestos lipídicos como el ácido butírico (C4:0), los fosfo- y esfingolípidos y el CLA, con reconocidos efectos cardioprotectores y anticancerígenos, lo que ha llevado a un reconocimiento de la contribución de la leche y de los productos lácteos elaborados a partir de leche entera a una dieta saludable, así como a la prevención de enfermedades a través del desarrollo de alimentos funcionales (Fontecha *et al.*, 2011). Por lo tanto, el consumo moderado de grasa láctea podría aportar beneficios en el mantenimiento de la salud y en la prevención de enfermedades crónicas en humanos.

### 1.2. LA LECHE DE CABRA

La leche de cabra muestra una gran variabilidad en cuanto a su composición bioquímica y a sus propiedades tecnológicas, dependiendo principalmente de la alimentación y de otros factores intrínsecos (genética, edad, período de lactancia, etc.) y extrínsecos (ordeño y condiciones climáticas). La composición de la leche de cabra no difiere notablemente de la leche de vaca en términos de extracto seco, proteína, lactosa y contenido en cenizas (**Tabla 1.1**), pero presenta una serie de propiedades intrínsecas interesantes debido a una mayor presencia de compuestos biológicamente activos, como los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (C4:0-C10:0) y de cadena media (MCFA) (C12:0-C14:0), que la hacen más atractiva desde el punto de vista de la salud y para la elaboración de productos de alto valor añadido como el queso (Fontecha *et al.*, 2011; Dejenie & Adugna, 2014).

La leche de cabra es una fuente excelente de proteínas de alta calidad y de fácil absorción. La composición proteica de la leche de cabra contiene bajos niveles de caseína  $\alpha_{s1}$  en comparación con la leche de vaca, lo que produce una menor tensión de la cuajada, es decir, una mayor suavidad durante la digestión. Además, la elevada capacidad de retención de agua y la baja viscosidad de las proteínas de la leche de cabra resultan en una mejor actuación de las proteasas del estómago, lo que mejora

su digestibilidad (Jenness, 1980). Adicionalmente, los minerales presentes en la leche de cabra como el calcio y el fósforo, que se encuentran principalmente asociados a las caseínas de la leche, están en proporciones óptimas para su absorción (Ca:P 1.0:1.5).

**Tabla 1.1.** Composición media de los nutrientes básicos de la leche de cabra, oveja y vaca.

Composición	Cabra	Oveja	Vaca
Grasa (%)	3.8	7.9	3.6
Sólidos totales (%)	8.9	12	9
Lactosa (%)	4.1	4.9	4.7
Proteína (%)	3.4	6.2	3.2
Cenizas (%)	0.8	0.9	0.7
Calorías/100 mL	70	105	69

La composición lipídica determina la calidad nutricional de la leche de cabra debido a su importancia en la producción y en la calidad de los productos lácteos, afectando directamente a las características organolépticas. El pequeño tamaño de los glóbulos de grasa de la leche de cabra le proporciona, además, una mejor dispersión que mejora la eficiencia de la lipasa pancreática, mejorando así la digestibilidad y la textura de los productos lácteos (Yanguilar, 2013). Asimismo, los glóbulos de la grasa de leche de cabra no sufren coalescencia al enfriarse debido a la falta de aglutinina, que es la responsable de la agregación de los glóbulos en la leche de vaca (Kompan & Komprej, 2012).

Por lo tanto, la leche de cabra forma parte de la tendencia actual de alimentación saludable en los países desarrollados gracias a sus propiedades inherentes, convirtiéndola en una alternativa atractiva para el desarrollo de nuevos productos lácteos (Yanguilar, 2013; Medeiros *et al.*, 2014).

### 1.2.1. FRACCIÓN LIPÍDICA DE LA LECHE DE CABRA Y SALUD

La grasa es uno de los componentes más importantes de la leche de cabra en cuanto a características nutricionales, físicas, químicas y sensoriales de los productos lácteos. Se presenta en forma de glóbulos rodeados por la MFGM. En su composición figuran también otros lípidos simples (diglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG), ésteres de colesterol (CE) y ceras), lípidos complejos (fosfolípidos), CHOL, antioxidantes (tocoferoles) y escualeno. Asimismo, los lípidos lácteos constituyen el vehículo de las vitaminas liposolubles (A, E, D y K) y carotenoides.

La composición lipídica de la leche de cabra muestra importantes diferencias con la leche de vaca. Por un lado, como ya se ha indicado, la grasa láctea de cabra contiene una mayor presencia de SCFA y MCFA que la leche de vaca (15-18% frente a 5-9% del total de FA, respectivamente) (Haenlein, 2004), entre los que destacan el ácido caproico (C6:0), el ácido caprílico (C8:0) y el ácido cáprico (C10:0), los cuales desempeñan un papel clave en el desarrollo de los compuestos responsables del sabor y del aroma (Fontecha *et al.*, 2011), ejercen actividades antivirales y antibacterianas tanto en ensayos *in vitro* como en animales de experimentación y no se relacionan con las CVD (Hilmarsson *et al.*, 2006). Además, los SCFA y MCFA de la dieta se hidrolizan en nuestro organismo, absorbiéndose desde el intestino al sistema circulatorio sin resíntesis de TAG y son empleados como fuente de energía rápida, por lo que tienen baja tendencia a acumularse en el tejido adiposo (Calvo *et al.*, 2014).

German *et al.* (2009) sugirieron que, en la grasa láctea, únicamente la fracción correspondiente a los ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) podría considerarse como no saludable y aumentar el riesgo de sufrir CVD en el supuesto de que se produjera un consumo excesivo de forma aislada (Parodi, 2009). El ácido esteárico (C18:0) se encuentra presente en la grasa láctea en un contenido superior al 10%. Dicho compuesto es considerado neutro desde la perspectiva de la salud humana, aunque sin duda se ha demostrado que es tan efectivo para reducir el CHOL plasmático como el ácido oleico (*cis*-9 C18:1), también presente en la grasa láctea en concentraciones altas, del 15% al 23% del total de FA (Vlaeminck *et al.*, 2006).

Otros compuestos presentes en la grasa de leche, particularmente en la leche de cabra, son los ácidos grasos de cadena impar, sintetizados mayoritariamente por la acción de enzimas bacterianas del rumen (Alonso *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2014). Éstos se utilizan para determinar el correcto funcionamiento de la cavidad ruminal y como marcadores del consumo humano de grasa láctea al no encontrarse en otras grasas animales. Los mayores contenidos están descritos para los FA C15:0 y C17:0, aunque también se han identificado los isómeros ramificados *iso* C15:0, *anteiso* C15:0, *iso* C17:0, *anteiso* C17:0 e *iso* C16:0 (Vlaeminck *et al.*, 2006). Es importante destacar que la presencia de estos FA le confiere a la grasa láctea de cabra un menor punto de fusión frente a otras grasas animales saturadas, proporcionándole asimismo unas propiedades químicas y físicas diferentes que afectan de manera positiva a su digestibilidad y favorecen su biodisponibilidad. Asimismo, los FA de cadena impar han demostrado poseer un “efecto protector” ante algunas enfermedades como la diabetes tipo 2, la enfermedad coronaria y otras CVD (Soedamah-Muthu *et al.*, 2011; Astrup *et al.*, 2014; Alexander *et al.*, 2016).

La presencia de TFA “de origen natural” en la grasa láctea y su relación con la salud cardiovascular es un tema que genera gran controversia. Se ha demostrado que los TFA de “origen industrial”, obtenidos a partir de procesos de hidrogenación parcial de aceites vegetales, aumentan el riesgo de sufrir enfermedades coronarias al originar un incremento en la relación LDL/HDL (Lichtenstein *et al.*, 2003; Mensink *et al.*, 2003). Así, aunque los perfiles de TFA de la grasa láctea y de los aceites vegetales parcialmente hidrogenados guardan similitudes considerables, éstos difieren en las proporciones en las que se hayan presentes los distintos isómeros *trans*. Por tanto, el riesgo asociado a su consumo parece depender tanto del tipo de alimento que forma parte de la dieta como de su contenido en TFA (Calvo *et al.*, 2014). La alimentación del ganado es el factor que más afecta al contenido de TFA en la grasa láctea (entre el 2% y el 6% del total de FA). En general, en comparación con la de los demás rumiantes, la leche de cabra es la que menor contenido en TFA contiene. Durante la hidrogenación de las grasas vegetales se forma un amplio rango de TFA monoinsaturados, principalmente de ácido elaídico (*trans*-9 C18:1). En cambio, el isómero cuantitativamente más importante en la grasa láctea es el ácido vacénico (TVA) (*trans*-11 C18:1), constituyendo entre un 30 y un 50% del total de TFA. Son numerosos los estudios publicados recientemente que sugieren que el consumo moderado de TFA por la ingesta de productos lácteos podría no contribuir a aumentar el riesgo cardiovascular (CVR) (Gayet-Boyer, 2011; Nestel *et al.*, 2014) y que, en particular el TVA, podría ejercer efectos beneficiosos en el metabolismo de lípidos y dislipidemia (Field *et al.*, 2009), y de protección frente a aterosclerosis en modelos animales (Gayet-Boyer, 2011). Estas posibles contradicciones podrían ser debidas al doble papel que juega el TVA en el metabolismo ya que, aunque es un TFA, es el precursor fisiológico del ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11 C18:2, RA), el isómero mayoritario del CLA y el compuesto bioactivo presente más relevante de la grasa láctea. La síntesis de RA ocurre, en el 90% de los casos, de forma endógena en la glándula mamaria, implicando la actividad de la enzima *delta*-9-desaturasa a partir del TVA (Griinari *et al.*, 1998), pero también se ha confirmado la bioconversión a CLA, metabólicamente activo en tejidos animales y humanos (Jutzeler *et al.*, 2010).

Respecto a los PUFA, el más abundante en la grasa láctea es LA, seguido de ALA, el único FA omega-3 (n3) presente de forma natural, aunque con niveles que no suelen superar el 0.7% del total de FA (Gómez-Cortés, 2009). LA y ALA, además, no son únicamente esenciales para la síntesis de PUFA de mayor longitud de cadena, sino que promueven beneficios sobre las CVD (Fontecha *et al.*, 2011).

La grasa láctea es la principal fuente de CLA de nuestra dieta (0.7%-1.2%) y es, sin duda, el componente que ha adquirido mayor relevancia en las últimas décadas. El

nombre genérico de CLA es un término colectivo que describe una mezcla de diversos isómeros geométricos y posicionales de LA. Aunque la grasa de la leche de oveja y de vaca parecen tener un contenido más elevado de CLA que la leche de cabra (1.08%, 1.01% y 0.65% del total de FA, respectivamente), Chilliard y Ferlay (2004) corroboraron que dichos niveles de CLA varían estacionalmente debido a los cambios en la alimentación de los rumiantes. Pero es el RA, el isómero mayoritario de CLA, el que más investigaciones está generando entre los FA de la grasa láctea. Aunque gran parte de estos trabajos se ha llevado a cabo con mezclas sintéticas equimoleculares de dos isómeros de CLA (*cis-9, trans-11* y *trans-10, cis-12*), los resultados sugieren que el RA es el responsable, en mayor medida, de los efectos antiaterogénicos y anticancerígenos, así como de la mejora de las funciones inmunológicas (Parodi, 2009; McCrorie *et al.*, 2011). Aunque el CLA parece poseer efectos potencialmente beneficiosos en el ámbito de la salud humana, debido a sus propiedades antiarterioscleróticas y antidiabéticas, su capacidad para disminuir la grasa corporal, favorecer la absorción de Ca, mejorar la respuesta inmunitaria y disminuir el riesgo de padecer CVD (Calvo *et al.*, 2011), son necesarias más investigaciones en humanos para conocer la dosis necesaria de CLA y así conseguir un efecto biológico significativo (Parodi, 2009; Kim *et al.*, 2016). De hecho, en la actualidad existe un elevado número de estudios clínicos en marcha con el objetivo de aclarar el establecimiento de la dosis de CLA adecuada para lograr en humanos los efectos biológicos descritos en animales de experimentación. En definitiva, si todas las ventajas fisiológicas atribuidas al CLA fueran trasladables a humanos, el aumento de la ingesta de estos compuestos podría repercutir positivamente sobre el valor nutricional de los alimentos que los contengan, como es el caso de la leche y los productos lácteos (Calvo *et al.*, 2011)

En cuanto a los PL (fosfo- y esfingolípidos), éstos se encuentran presentes tanto en tejidos vegetales como animales, y son constituyentes fundamentales de las membranas celulares, justificado por su naturaleza anfifílica. Más específicamente, los PL presentes en la leche (0.2-2% del total de grasa) son los principales constituyentes de la MFGM e incluyen principalmente fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomiélin (SM), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS). Debido a su carácter lipofílico e hidrofílico, los PL de la MFGM se encuentran profundamente implicados en el metabolismo celular, juegan un papel importante en la señalización neuronal y están vinculados a las enfermedades relacionadas con la edad (capacidad cognitiva, demencia, etc.), la inmunidad y la respuesta inflamatoria. Otros compuestos como el CHOL, los ácidos grasos libres (FFA), los glicéridos totales o parciales, las

glicoproteínas y los glicolípidos (cerebrósidos y gangliósidos) se encuentran también formando parte de la membrana (Singh, 2006).

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han dirigido sus investigaciones a la determinación de las actividades biológicas de los PL de la dieta sobre la salud. Entre ellas, cabe mencionar su papel en el transporte y la transferencia de nutrientes liposolubles a lo largo del tracto gastrointestinal, su carácter antioxidante, sus propiedades antimicrobianas y antivirales, así como su efecto protector frente a la úlcera gástrica y a los patógenos gastrointestinales (Calvo *et al.*, 2011). Además, otros estudios recientes han demostrado que los PL pueden desarrollar funciones importantes como agentes activos frente al cáncer de colon (Dial *et al.*, 2006; Visioli y Strata, 2014) y han demostrado tener un gran impacto debido a sus potenciales beneficios sobre el desarrollo cognitivo y las enfermedades neurodegenerativas en humanos (Alzheimer, depresión, estrés), principalmente SM, PC y PS (Zeisel, 2004). En un estudio llevado a cabo en animales de experimentación (Wat *et al.* 2009), se observó que los efectos beneficiosos de los PL sobre las enfermedades hepáticas fueron especialmente significativos cuando la fuente de PL era de origen lácteo, en comparación con los PL de la soja y del cártamo, posiblemente debido a la importancia de la composición de cada PL en el alimento y no a su grado de saturación. Además, se ha demostrado que los PL de origen lácteo son potentes agentes antibacterianos que mejoran la resistencia contra algunos patógenos intestinales (Sprong *et al.*, 2001). Por otro lado, aunque todavía no se ha relacionado la funcionalidad de los PL de la dieta con el rendimiento en el ejercicio físico, Kingsley *et al.* (2005) relacionaron recientemente las propiedades ergogénicas de la PS durante la actividad física, y Jäger *et al.* (2007) sugirieron que la suplementación con PC previa al ejercicio podría mejorar el rendimiento de deportistas de fondo.

En cuanto a los efectos de los PL en la hiperlipidemia y el CVR, Conway *et al.* (2014) sugirieron una disminución de los niveles plasmáticos de CHOL y TAG en humanos después del consumo de fosfo- y esfingolípidos procedentes de la MFGM. Sin embargo, es necesario investigar más profundamente los mecanismos de acción para confirmar los efectos de estos compuestos.

### **1.2.2. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR EL PERFIL LIPÍDICO DE LA LECHE**

La evolución del consumo de grasa en la dieta y el aumento de la incidencia de las CVD corroboran la necesidad actual de mejorar la calidad nutricional de la grasa láctea. La grasa es una materia prima esencial en los programas modernos de alimentación de los rumiantes de alta productividad, especialmente para los animales

en lactación debido a su gran aporte energético. Sin embargo, la inclusión de grasas en la dieta puede ser utilizada no sólo para aumentar la entrada de energía, sino también para afectar el metabolismo ruminal, modificar el reparto de nutrientes y mejorar el perfil nutricional de los FA de la grasa láctea.

Por un lado, la composición lipídica de los productos lácteos puede modificarse de manera industrial mediante el enriquecimiento o la adición de FA con efectos beneficiosos sobre la salud como el CLA (Laso *et al.*, 2007). En cuanto a las técnicas de manejo del ganado para producir leche y productos lácteos con un perfil lipídico más saludable, la selección genética para cambiar la proporción de FA, el régimen de pastoreo, la cantidad y la naturaleza de los forrajes de la dieta y la suplementación lipídica de la dieta, en especial de semillas o aceites de oleaginosas y de pescado, son consideradas las principales estrategias dietéticas para mejorar el perfil lipídico de la leche con fines en la salud humana. El contenido graso de la dieta de los rumiantes puede afectar al metabolismo ruminal y modificar el reparto de nutrientes para mejorar el perfil nutricional de FA, por lo que es importante el estudio del efecto de la suplementación con diferentes fuentes lipídicas animales y vegetales en la alimentación de los rumiantes y su efecto sobre la composición lipídica para no afectar al rendimiento lácteo y para que la suplementación no produzca cambios indeseables en la composición físico-química de la leche (Gómez-Cortés, 2009).

### **1.2.2.1. Modificación de la dieta de los rumiantes**

El bajo contenido de FA n3 y CLA de la grasa láctea requiere la elaboración de estrategias óptimas de nutrición, el principal factor ambiental que regula la síntesis de grasa láctea en rumiantes y, por lo tanto, la composición lipídica de la leche y de los productos lácteos para mejorar su composición lipídica (Chilliard *et al.*, 2007).

#### **a. Incorporación de pasto fresco en la alimentación y modificación de la relación forraje:concentrado**

La aplicación de sistemas de producción extensivos basados en el consumo de pasto puede ser una estrategia muy útil para la producción de leche con un contenido elevado de ALA y CLA (Torral *et al.*, 2009; Mele *et al.*, 2011). El pasto fresco es rico en fibra y posee altos niveles de ALA, cuya biohidrogenación en el rumen y su absorción en el intestino genera importantes cantidades de TVA y de RA en la leche (Gómez-Cortés, 2009). Sin embargo, conviene destacar que un cambio en la calidad del pasto



podría modificar considerablemente el perfil lipídico de la leche, y que los niveles máximos de CLA en la leche de los rumiantes coincide con el período en el que el pasto se encuentra disponible de manera más abundante (primavera y otoño) (Collomb *et al.*, 2004; Toral *et al.*, 2009).

En cuanto a la modificación de la relación forraje:concentrado como estrategia para modificar la composición lipídica de la leche, Piperova *et al.* (2002) demostraron que la alimentación de los rumiantes con una dieta con una baja relación forraje:concentrado puede modificar el patrón del metabolismo ruminal, produciendo la proliferación de bacterias implicadas en las rutas de biohidrogenación alternativas, y aumentar así los niveles de algunos TFA como el FA *trans*-10 C18:1. La acumulación del FA *trans*-10 C18:1 produce, además, una disminución del contenido de RA en la grasa láctea y una disminución del rendimiento lechero (Toral *et al.*, 2009).

Así pues, se ha constatado que una de las claves para conseguir niveles óptimos de CLA en la leche de los rumiantes es el consumo adecuado de forrajes de alta calidad para mantener estable el funcionamiento ruminal.

### b. Suplementación con lípidos de origen vegetal

Se ha demostrado que los suplementos lipídicos basados en aceites o semillas vegetales ricos en LA y ALA son el sustrato idóneo para aumentar los niveles de CLA en la leche de rumiantes (Gómez-Cortés, 2009). Las semillas de lino, colza, soja y el aceite de oliva son las principales fuentes de FA estudiadas como suplemento en las dietas de rumiantes lactantes (Glasser *et al.*, 2007). Además, los aceites en forma libre son más efectivos para mejorar la composición lipídica de la leche que la adición de semillas a la dieta de los rumiantes por la mayor disponibilidad de los FA en la microbiota de la cavidad ruminal (Lock *et al.*, 2004).

En particular, la adición de aceites ricos en LA (girasol y soja) a la dieta del ganado ovino y caprino triplica el contenido de CLA en la grasa láctea debido a la formación de RA mediante dos vías: la biohidrogenación de LA en el rumen y la desaturación de TVA en la glándula mamaria, mientras que el ALA únicamente contribuye a los niveles de RA por síntesis endógena a partir de TVA (Gómez-Cortés, 2009).

No obstante, la respuesta a la suplementación con aceites en la dieta sobre el rendimiento de los animales y la composición lipídica de la leche puede variar considerablemente según la especie de rumiante. En el ganado vacuno, la suplementación puede provocar el síndrome de bajo contenido de grasa de leche, atribuido a la formación de *trans*-10 C18:1 que, junto con otros isómeros de CLA (*trans*-10, *cis*-12 y *trans*-9, *cis*-11), inhiben la síntesis de grasa en la glándula mamaria

y afecta al rendimiento productivo de los animales. Los datos disponibles en ovejas y cabras indican que el uso de suplementos lipídicos podría incluso aumentar el contenido graso de la leche debido a una distinta sensibilidad a los metabolitos inhibidores de la síntesis grasa. Asimismo, en el caso de los animales que se encuentran en estabulación permanente, la inclusión en la dieta de aceites vegetales ricos en LA como el aceite de girasol, permitiría aumentar el contenido lipídico de CLA en la leche sin producirse efectos adversos sobre el rendimiento productivo lechero.

La forma en la que se incorporan los sustratos lipídicos en la dieta de los rumiantes influye en los niveles de RA y TVA que son incorporados a la grasa láctea. Por un lado, el uso de semillas oleaginosas enteras resultaría, en principio, menos tóxico para los microorganismos ruminales debido a una lipólisis e hidrogenación más lenta al encontrarse los lípidos en el endospermo, que con sus respectivos aceites. Sin embargo, estudios recientes defienden que la cubierta de las semillas puede dificultar que las enzimas responsables entren en contacto con los TAG, complicando así la biohidrogenación ruminal (Chilliard *et al.*, 2009; Rodríguez-Alcalá, 2009).

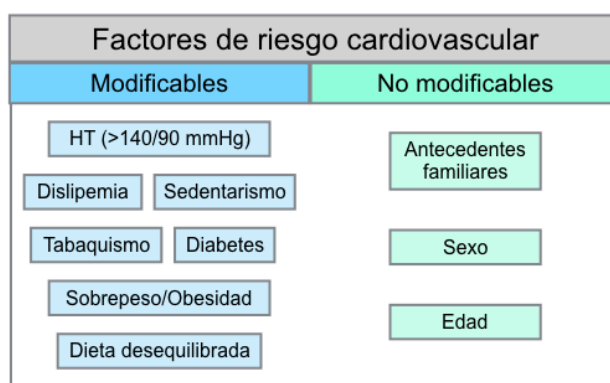
Por otro lado, la incorporación de semillas procesadas (en forma extrusionada, micronizada, molida, etc.) como suplemento lipídico en la dieta de los rumiantes aumenta la accesibilidad de ALA a los microorganismos presentes en la cavidad ruminal, produciendo un mayor contenido de CLA en la leche (Bauman *et al.*, 2006). Más específicamente, en el proceso de extrusión, las semillas son llevadas a condiciones de alta presión y temperatura (300-400 °C) para desactivar los compuestos cianogénicos y las lipasas responsables de la digestibilidad en el intestino delgado. Las semillas de lino son consideradas una de las principales fuentes de FA n3 de origen vegetal (Legrand *et al.*, 2010) debido a su alto contenido de ALA (50-60% del total de FA) y a su menor concentración de SFA en comparación con otras semillas oleaginosas como la soja, el algodón, el maíz y el girasol (Maddock *et al.*, 2006). La suplementación de la dieta del ganado caprino con semillas de lino extruidas produce un aumento de la concentración de ALA mayor que con el aceite de la misma semilla (Giger-Reverdin *et al.*, 2014). Además, las semillas de lino son consideradas una fuente fiable para aumentar el contenido de VA y RA en la leche de ovejas y de cabras (Chilliard *et al.*, 2007, Gómez-Cortés *et al.*, 2009). Al mismo tiempo, la demanda de alimentos más saludables por parte de los consumidores ha provocado que exista un gran interés en mejorar el perfil lipídico de la leche y de los productos lácteos de manera natural a través de la alimentación de los rumiantes, destacando el ganado caprino (Altenhofer *et al.*, 2014).

### 1.3. LOS PRODUCTOS LÁCTEOS Y SU RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las CVD son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen la cardiopatía coronaria, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas y congénitas y la trombosis, siendo la causa más frecuente la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón o el cerebro (OMS, 2015). Las CVD son la principal causa de muerte en los países desarrollados, y en España se sitúan como la primera causa de muerte, representando el 29.66% del total de fallecimientos, por encima del cáncer (27.86%) y de las enfermedades del sistema respiratorio (11.08%) (INE, 2016). Consecuentemente, en las últimas décadas ha despertado un enorme interés el estudio de los mecanismos que subyacen a los factores de CVR, así como de las estrategias para su prevención actuando sobre el diagnóstico, el tratamiento y la investigación de las CVD.

#### 1.3.1. Factores de riesgo cardiovascular

Un factor de CVR es una característica biológica o una conducta que aumenta la probabilidad de padecer o morir de una CVD en aquellos individuos que la presentan. El desarrollo de las CVD es promovido por varios factores de riesgo, los cuales pueden ser modificables y no modificables (**Figura 1.1**). Además, el cambio social, económico y cultural, la globalización y el envejecimiento de la población, la pobreza, el estrés y los factores hereditarios modifican el riesgo de padecer una enfermedad. No obstante, la importancia de cada factor de riesgo es muy relativa y puede variar en diferentes poblaciones (Lobos *et al.*, 2011).



**Figura 1.1.** Principales factores de riesgo cardiovascular.

### 1.3.1.1. Factores de riesgo modificables

Los factores modificables son aquellos susceptibles a mejorar y están sujetos a medidas preventivas, ya sea cambiando el estilo de vida o con terapia farmacológica, y son los responsables del 75% de las CVD a nivel mundial (WHO, 2016).

- a. La **hipertensión arterial (HT)** es la elevación de los niveles de presión arterial (PA) de forma continua o sostenida. La PA es la presión que el corazón ejerce sobre las arterias para conducir la sangre hacia los diferentes órganos del cuerpo. La HT se diagnostica cuando se alcanza de manera repetida una elevada presión sistólica ( $\geq 140$  mm Hg), definida como la presión de las arterias cuando el corazón se contrae, o una alta presión diastólica ( $\geq 90$  mm Hg), que ocurre cuando el corazón se relaja entre las contracciones o latidos.
- b. El **tabaquismo** es la adicción al tabaco provocada, principalmente, por uno de sus componentes activos, la nicotina; y es el causante del 10% de las defunciones a nivel mundial por enfermedades como la bronquitis crónica, el enfisema pulmonar y el cáncer de faringe y de pulmón.
- c. La **diabetes mellitus** es un conjunto de trastornos metabólicos que se produce cuando la glucosa en ayunas se encuentra de manera persistente en concentraciones elevadas a  $\geq 7.0$  mmol/L (126 mg/dL), debido a un defecto en la producción de insulina, a una resistencia a la acción de ella para utilizar la glucosa o a una combinación de estas causas.
- d. La **falta de actividad física** o sedentarismo se define como la no realización de 30 minutos de actividad física moderada al menos 5 veces a la semana o de 20 minutos de actividad vigorosa al menos 3 veces a la semana o equivalente, y es considerada uno de los mayores factores de riesgo en el desarrollo de las CVD.
- e. La **dieta desequilibrada** rica en SFA, TFA, azúcares y sal y, consecuentemente, baja en frutas, verduras y pescado. En un informe reciente y exhaustivo sobre la dieta española se concluye, entre otras observaciones, que el consumo medio de energía y nutrientes excede en un 80% el consumo recomendado en adultos (MAPAMA, 2017).
- f. La **dislipidemia (o dislipemia)** es la alteración que se manifiesta en concentraciones anormales de lípidos en la sangre (CHOL, TAG, HDL y LDL). La dislipemia es un factor de riesgo con mayor prevalencia en los países desarrollados. Su causa puede deberse a factores hereditarios, pero también a trastornos digestivos y hepáticos, a una alimentación inadecuada e insuficiente actividad física.

- g. El **sobrepeso y la obesidad** se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (BMI) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) y la obesidad ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) en los adultos. La prevalencia de la obesidad en España se ha duplicado en los últimos 15 años, lo que la sitúa en cifras nunca antes alcanzadas: un 14.5% en la población adulta, siendo uno de los países de Europa con mayor prevalencia (OMS, 2017).

#### 1.3.1.2. Factores de riesgo no modificables

Entre los factores de riesgo no modificables destacan los siguientes:

- a. **Edad:** aunque el envejecimiento no es una causa directa de las CVD, éstas son más comunes entre las personas de edad avanzada debido a la consecuencia del estilo de vida y de la acumulación de múltiples factores de riesgo.
- b. **Sexo:** el sexo masculino por debajo de los 50 años posee una incidencia más elevada de CVD que las mujeres en el mismo rango de edad. Sin embargo, a partir de la menopausia, los índices de CVD entre sexos se igualan, debido a la relación existente entre los niveles de hormonas femeninas y el perfil lipídico sanguíneo.
- c. **Antecedentes familiares:** la correlación entre los antecedentes familiares y un mayor CVR ocurre principalmente como consecuencia de los factores genéticos.

El tratamiento de las CVD se basa en tres elementos fundamentales: el control de la dieta, el uso de fármacos y la realización de ejercicio físico. Éstos no se centran únicamente en paliar los sucesos cardiovasculares, sino en prevenir su aparición y sus posibles complicaciones. La terapia no farmacológica constituye un factor fundamental en la prevención y el tratamiento de las CVD, ya que el objetivo principal es la reducción del uso de fármacos y evitar así sus posibles efectos secundarios. Las recomendaciones nutricionales orientadas en la prevención y el tratamiento de las CVD se basan en el control de la calidad y de la cantidad de grasa presente en la dieta, la reducción del consumo de sal y el control del perfil lipídico sanguíneo. Debido a la gran influencia que ejercen los factores de CVR modificables relacionados con la alimentación y el estilo de vida, en esta terapia también se incluyen las recomendaciones relacionadas con los hábitos de vida sana (realizar ejercicio físico regular, mantener un peso corporal óptimo, el abandono del tabaco, etc.).

Cuando las recomendaciones nutricionales y los cambios en el estilo de vida no son suficientes para la prevención y la reducción del CVR, se deben utilizar las terapias

farmacológicas o los medios quirúrgicos, así como las diferentes técnicas de fisioterapia y rehabilitación (WHO, 2016).

#### 1.4. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Los marcadores de CVR son indicadores anatómicos, fisiológicos, bioquímicos o moleculares presentes en la sangre y cuyos niveles (aumento o disminución) aportan información clave sobre el estado de salud de un individuo y la probabilidad de sufrir CVD (Prabhakaran *et al.*, 2016). Un marcador sanguíneo ideal sería aquel que proporcionara objetivamente información diagnóstica, pronóstica y terapéutica adicional a la que se obtiene a partir de los datos clínicos de un paciente y debería, además, tener una baja variabilidad, una alta reproducibilidad y un bajo coste (Balagopal *et al.*, 2011). El uso de nuevos marcadores que, sumados a los ya conocidos, ayudan a realizar un rápido diagnóstico del riesgo de un individuo a sufrir un sucesos cardiovasculares y a establecer el tratamiento adecuado, ha aumentado de forma notable en la última década (**Figura 1.2**) (Mateos-Cáceres, 2009).

Marcadores de riesgo cardiovascular					
Marcadores lipídicos					
Lípidos séricos			TAG	Apolipoproteínas	
CHOL	HDL	LDL		ApoA1	ApoB
Marcadores de inflamación					
CRP		IL-6		TNF-α	
Marcadores de ingesta					
Grelina			Leptina		
Nuevos biomarcadores “ómicos”					

**Figura 1.2.** Principales marcadores de riesgo cardiovascular.

##### 1.4.1. Marcadores lipídicos plasmáticos de riesgo cardiovascular

###### a. Lípidos séricos

Las alteraciones del metabolismo lipídico se encuentran entre los factores de CVR más firmemente establecidos. El CHOL es un lípido presente en las membranas de las

células que forman tejidos en nuestro organismo, y su contenido elevado en sangre, es decir, la hipercolesterolemia, es considerado uno de los principales factores de riesgo de la CVD.

Las lipoproteínas plasmáticas, constituidas por lípidos y proteínas, transportan el CHOL y los lípidos esterificados de la sangre. La parte proteica de las lipoproteínas está compuesta por proteínas específicas denominadas apolipoproteínas, de composición relativamente constante. Los tres tipos principales de lipoproteínas que se encuentran en el suero son: las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). La medición de la cantidad de CHOL transportado por los diferentes tipos de lipoproteínas se ha convertido en una práctica clínica habitual. Con excepción de las HDL, que transportan el CHOL de los tejidos periféricos al hígado ejerciendo una acción vasoprotectora, las partículas lipídicas son más aterogénicas cuanto más CHOL transportan (de Goede *et al.*, 2015).

Dado que las LDL son las partículas con mayor densidad de CHOL (60-70% del CHOL total sérico), son las lipoproteínas con mayor poder aterogénico. Además, las partículas LDL más “pequeñas y densas” son más aterogénicas que las de mayor tamaño y menor densidad, debido a su menor afinidad por los receptores y su mayor susceptibilidad oxidativa que las LDL más “ligeras” (Astrup *et al.*, 2016). Aproximadamente el 60% de las LDL son captadas por el hígado, donde la apolipoproteína B (ApoB) se une específicamente a un receptor de membrana. El 40% de LDL restante son captadas por los tejidos extrahepáticos con receptores para ApoB y utilizan el CHOL para la síntesis de hormonas esteroideas y de las membranas, así como para la síntesis de vitamina D en la piel. Si existe un exceso de las LDL circulantes, los receptores de membrana se saturan. Consecuentemente, el exceso de LDL se oxida e induce una respuesta inflamatoria responsable de la mayoría de los procesos implicados en la disfunción endotelial, responsables del complejo mecanismo de la aterosclerosis y del daño vascular.

Las VLDL son lipoproteínas ricas en TAG que contienen entre el 10% y el 15% del CHOL total sérico. Éstas se producen en el hígado y juegan un papel importante en la aterogénesis (Ali *et al.*, 2012). Las partículas VLDL parcialmente degradadas enriquecidas de EC parecen estar implicadas en el desarrollo de la aterosclerosis de forma similar a las LDL. En cambio, los quilomicrones (QM) son ricos en TAG y pobres en CHOL libre y PL (Nilsen *et al.*, 2015).

Las HDL son partículas pequeñas y representan el 20-30% del CHOL total sérico. Estas lipoproteínas están compuestas por un 50% de proteínas, principalmente apolipoproteínas A-I (ApoA1) y A-II, y su función principal es captar el CHOL de los

tejidos periféricos y devolverlo al hígado, lo que se conoce como transporte reverso del CHOL. El CHOL de las membranas celulares y de otras lipoproteínas se transfiere a las HDL y se esterifica por la acción enzimática en presencia de ApoA. Los EC de las HDL son posteriormente transferidos al hígado, siendo finalmente eliminados. El CVR atribuido a la hipercolesterolemia se debe, por lo tanto, al incremento de LDL, mientras que los niveles séricos de HDL se consideran un importante factor antiaterogénico, habiéndose demostrado que su aumento se asocia a un efecto protector sobre el desarrollo de CVD (Gordon *et al.*, 1989). Aunque el cociente CHOL total/HDL ha demostrado ser un potente predictor de la aparición de CVD (Huxley *et al.*, 2012), estudios recientes han sustituido el CHOL total por los niveles de LDL para tener en cuenta la partícula lipoproteica aterogénica (Astrup *et al.*, 2016 ).

### b. Apolipoproteínas

La apolipoproteína A es un grupo de proteínas distribuidas en forma variable entre las diferentes lipoproteínas. La ApoA1 es la más abundante del plasma y está presente en las lipoproteínas HDL. Es sintetizada inicialmente en el hígado e intestino para posteriormente ser degradada hasta su forma madura en el plasma. La ApoA1 es el componente proteico de mayor concentración en las HDL y participa activamente en el transporte reverso del CHOL.

Por otro lado, la apolipoproteína B es una proteína de gran peso molecular presentes en los QM, en las VLDL y en las LDL, por lo que sus niveles son un reflejo de las partículas proaterogénicas. La ApoB es sintetizada en el hígado y secretada dentro de las VLDL, donde se mantiene hasta la conversión en LDL. La ApoB es el único componente proteico de las LDL, por lo que los niveles de ambos están correlacionados y vinculados con el CVR (Mozzafarian *et al.*, 2010), aunque son necesarios más estudios para demostrar su utilidad clínica como indicador de CVD e incorporarse en las recomendaciones (Mateos-Cáceres, 2009).

### c. Triglicéridos

Los niveles séricos elevados de TAG se producen habitualmente debido a un excesivo consumo de SFA en la dieta y están directamente relacionados con el inicio de la progresión de las enfermedades ateroscleróticas y la dislipidemia. Los niveles plasmáticos de TAG >200 mg/dL son considerados otro factor de riesgo independiente para las CVR y se asocian con un aumento de partículas LDL “pequeñas y densas” y una disminución de los niveles de HDL. Aunque son necesarios más estudios para



determinar la utilización de los TAG como marcador de CVD, los objetivos terapéuticos se basan en cambios en el estilo de vida (dieta equilibrada, pérdida de peso) para conseguir unas concentraciones deseables de LDL (Stone *et al.*, 2014). En una revisión reciente sobre los efectos del consumo de PUFA en lugar de SFA sobre las CVD, Mozaffarian *et al.* (2010) concluyeron que el aumento del consumo de PUFA en forma de aceite vegetal rico en LA reduce significativamente el riesgo de sufrir una enfermedad coronaria sin modificar los niveles plasmáticos de LDL o HDL. Por ello, podrían existir otros marcadores más importantes y la reducción de las calorías procedentes de SFA no necesariamente produciría una mejora en los niveles de algunos marcadores plasmáticos (Nilsen *et al.*, 2015; de Goede *et al.*, 2015).

### 1.4.2. Marcadores plasmáticos de inflamación

La inflamación es un proceso tisular constituido por fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas y biológicas. El estado inflamatorio puede ser inducido por una infección o por alteración en la respuesta inmunitaria, ya que se genera un proceso inflamatorio que suele ser crónico. Un proceso proinflamatorio crónico incrementa el riesgo de padecer diabetes, CVD y síndrome metabólico, siendo fundamental la modulación de la inflamación en la prevención y el tratamiento de estas enfermedades (Hunter *et al.*, 2013; Bordoni *et al.*, 2017). Consiguientemente, los marcadores de inflamación han emergido como un tema de investigación importante en las ciencias de la alimentación, la nutrición y el metabolismo de los alimentos (Klop *et al.*, 2012).

Numerosos estudios han caracterizado diversos elementos que intervienen en el proceso inflamatorio, y se han consolidado como predictores del riesgo de presentar un episodio cardiovascular, como la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el fibrinógeno, entre otros (Astrup *et al.*, 2016). La vida media tan corta de estas moléculas en la circulación hace que su introducción en la práctica clínica sea difícil y que se hayan incorporado nuevos marcadores de inflamación como la Proteína C Reactiva ultrasensible (CRP) por su estabilidad, precisión del análisis y asequibilidad (Shishehbor, 2004).

#### a. Proteína C Reactiva

La CRP es el biomarcador inflamatorio mejor caracterizado en la actualidad y ha sido establecido como un potencial marcador del CVR (Esposito *et al.*, 2004). Durante el proceso aterosclerótico se liberan moléculas proinflamatorias, entre las que se

encuentran la IL-6 y TNF- $\alpha$ . Estas moléculas proinflamatorias activan la liberación en el hígado de marcadores de inflamación como la CRP (Ridker, 2004). Mediante el análisis ultrasensible de la CRP puede detectarse la inflamación. Los valores que definen los tres grupos de riesgo según los niveles de CRP son: normal <1.0 mg/dL, intermedio entre 1.0 y 3.0 mg/dL y alto >3 mg/dL, que son los que se asocian al proceso aterosclerótico (Stone *et al.*, 2014).

Aunque son necesarios más estudios para determinar si diversas variables como la edad, el tabaquismo, el sexo, la menopausia y las enfermedades agudas pueden modificar los valores de CRP, ésta es considerada un predictor independiente para la población general y reúne las características necesarias para ser utilizada en la práctica clínica (Pearson *et al.*, 2003).

### b. IL-6 y TNF- $\alpha$

Las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  son péptidos señalizadores y mediadores químicos que se producen como respuesta a un proceso de inflamación. La IL-6 se produce en multitud de tejidos diferentes y actúa como regulador de la síntesis hepática en las proteínas durante la fase aguda del proceso de inflamación. Por otro lado, El TNF- $\alpha$  es secretado por el sistema inmunitario por monocitos, macrófagos, linfocitos, leucocitos y por otros tipos celulares como los adipocitos. La expresión de TNF- $\alpha$  está incrementada en los adipocitos de sujetos con sobrepeso y obesidad o dislipidemia, por lo que la investigación actual estudia la inclusión de otros marcadores en la evaluación de los procesos inflamatorios para una mejor prevención de las CVD (Balagopal *et al.*, 2011; Ramírez-Alvarado *et al.*, 2012).

### **1.4.3. Marcadores plasmáticos de ingesta**

Los biomarcadores de ingesta son aquellos propios de un alimento: un compuesto bioactivo, un componente alimenticio o un grupo de compuestos que provienen directamente de la digestión, de la absorción intestinal y de la biotransformación de éstos. Los biomarcadores nutricionales pueden proporcionar, por lo tanto, una medida objetiva de la ingesta y el estado nutricional.

El análisis de la relación entre la composición sanguínea de FA y su ingesta ha demostrado ser útil como herramienta de identificación de biomarcadores (Hodson *et al.*, 2008). Los FA pueden ser utilizados como una fuente rápida de energía o ser absorbidos y metabolizados por el tejido adiposo y muscular.

Estudios recientes se han centrado en el estudio de aquellos FA que no pueden sintetizarse de manera endógena y proporcionan, por lo tanto, una buena estimación de la ingesta dietética, del metabolismo de síntesis de FA y de la relación entre la calidad de la grasa de la dieta y el riesgo de sufrir CVD (C15:0, C17:0, TFA, LA, ALA, EPA y DHA).

Aunque las comparativas entre los estudios son todavía complejas debido a la multitud de fracciones sanguíneas lipídicas (plasma, eritrocitos, tejido adiposo), los FA se han consolidado como biomarcadores de ingesta tanto de manera cuantitativa como cualitativa (Ridker, 2004; Bordoní *et al.*, 2017).

#### **1.4.4. Nuevos biomarcadores “ómicos”**

Durante las últimas décadas se ha fomentado la investigación de nuevos marcadores relacionados con el proceso conocidos como la formación de la placa de ateroma. Los marcadores bioquímicos, como por ejemplo la leptina y la adiponectina, son fundamentales en el diagnóstico y el tratamiento de las CVD, pero no parecen mejorar la predicción del riesgo de manera consolidada. Estos hechos hacen pensar que un único marcador no es suficiente por sí mismo y que, por el contrario, un grupo de marcadores podrían formar un panel suficientemente sensible y específico en la evaluación de las CVD y las dislipemias (Mateos-Cáceres, 2009).

Debido a que las CVD son un grupo de enfermedades de gran complejidad y de carácter multifactorial, el empleo de las técnicas “ómicas” se ha posicionado como una importante estrategia en la búsqueda de nuevos marcadores y la identificación de nuevas moléculas implicadas en el desarrollo de enfermedades. Entre los nuevos marcadores en desarrollo, la lipidómica estudia la identificación de los marcadores del metabolismo lipídico e incluye el estudio de enfermedades como la diabetes, la insuficiencia cardíaca y la obesidad.

Por lo tanto, la integración de los factores de riesgo tradicionales junto con los biomarcadores emergentes es fundamental para una mejor predicción de las CVD (Ordovás, 2009; Martín, 2015).

### **1.5. LA GRASA LÁCTEA Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

La grasa influye de manera relevante en las características físicas, químicas y organolépticas de los alimentos. Actualmente, son muchas las investigaciones y metaanálisis que han demostrado la ausencia de asociación no sólo entre el consumo de grasa láctea y las CVD (Hjerpsted *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Lovegrove *et al.*,

2016), sino también entre la ingesta de SFA y la enfermedad coronaria en individuos sanos (de Souza *et al.*, 2015; Astrup *et al.*, 2016).

En las últimas décadas ha despertado un gran interés el estudio de los FA de la grasa láctea. En una revisión reciente sobre los productos lácteos y las CVD, Rice (2014) puso de manifiesto que el consumo de leche, queso y yogur se asocia inversamente con el riesgo de sufrir ECV. Posteriormente, Kim *et al.* (2016) asociaron la ingesta de productos lácteos elaborados a partir de leche entera con una disminución del 12% de riesgo de sufrir CVD y un 13% menos de sufrir un accidente cerebrovascular, en comparación con aquellos individuos con un bajo consumo de grasa láctea. Recientemente, Alexander *et al.* (2016), en otro metaanálisis y tras analizar los resultados de 31 estudios clínicos en humanos, asociaron el consumo habitual de queso con un menor riesgo de sufrir un suceso cerebrovascular, una reducción del 8% del riesgo de sufrir una enfermedad coronaria y un 13% menos de sufrir un accidente cardiovascular. En este sentido, Ratnayake *et al.* (2015) destacaron la importancia de mantener un buen equilibrio entre los distintos grupos de SFA de la grasa láctea, incluso entre aquellos que parecen tener un efecto hipercolesterolémico cuando se consumen de manera aislada (C12:0, C14:0 y C16:0).

Aunque se precisan más estudios para determinar y esclarecer los posibles efectos sobre la salud derivados del consumo de los diferentes isómeros *trans* procedentes de la grasa láctea, estudios recientes le han atribuido al RA la mayor parte de las propiedades biológicas del CLA, así como los efectos anticarcinogénicos y antiaterogénicos (Gómez-Cortés, 2009; Gómez-Castro, 2015). LA y ALA, precursores de otros PUFA (EPA y DHA) con efectos beneficiosos sobre la reducción del CVR, son constituyentes de los PL lácteos y resultan imprescindibles para mantener la fluidez de las membranas celulares. En cuanto a los PUFA esenciales que están presentes en la grasa láctea (LA y ALA) y son precursores de otros FA con reconocido efecto positivo para salud cardiovascular (EPA y DHA), son los constituyentes fundamentales de los fosfolípidos y resultan imprescindibles para mantener también la fluidez de las membranas celulares (Parodi, 2009; Kim *et al.*, 2016).

El consumo de productos lácteos elaborados a partir de leche entera no sólo no aumenta los niveles plasmáticos de LDL en humanos (Hjerpsted *et al.*, 2011), sino que el consumo de queso podría incluso reducir la concentración sanguínea de CHOL, LDL y aumentar los niveles de HDL en humanos (de Goede *et al.*, 2016). Por último, Labonté *et al.* (2013) sugirieron que el consumo de algunos productos lácteos fermentados podría ejercer un efecto antiinflamatorio en voluntarios sanos (IL-6 y TNF- $\alpha$ ). El consumo de la combinación de tres raciones de productos lácteos en el marco de una dieta equilibrada por parte de adultos con síndrome metabólico

demostró tener, en un ensayo clínico posterior, una mejora significativa de algunos parámetros de inflamación sistémica (Labonté *et al.*, 2014).

Aunque se requieren más estudios clínicos en humanos específicos para evaluar el consumo de grasa láctea y poder así justificar los mecanismos sobre los que mejoran el perfil lipídico y los marcadores de inflamación en humanos, la leche y los productos lácteos no ejercen efectos negativos sobre los marcadores plasmáticos de CVR e incluso podrían disminuir algunos parámetros de inflamación sistémica en sujetos con sobrepeso y obesidad (Drouin-Chartier *et al.*, 2016).

## **1.6. ALIMENTOS LÁCTEOS FUNCIONALES Y SALUD CARDIOVASCULAR**

Un alimento funcional es aquel que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, puede proporcionar beneficios para la salud o reducir el riesgo de padecer enfermedades. Los alimentos no sólo son considerados fuentes de energía y de nutrientes que aseguran la supervivencia de un individuo, sino que, además, se encuentran estrechamente relacionados con el mantenimiento y la promoción de la salud, la mejora del bienestar general y la reducción del riesgo de padecer enfermedades, entre ellas las CVD. En las últimas décadas ha despertado un enorme interés el estudio de los efectos beneficiosos de los alimentos funcionales a través de la incorporación de ingredientes con actividad biológica. El aumento de la concentración de un componente naturalmente presente con efectos beneficiosos, la dosis exacta y su biodisponibilidad en una matriz alimentaria distinta a la habitual, así como la eliminación de constituyentes no deseados o en la modificación de otros, ha producido un aumento exponencial de la variedad de productos comercializados.

El consumo de alimentos funcionales no sustituye la necesidad de mantener unos hábitos de vida saludables, incluyendo el consumo de una dieta equilibrada y la práctica regular de ejercicio físico. El mercado de la industria alimentaria, además, va encaminado hacia el diseño de nuevos alimentos que satisfagan las expectativas del consumidor, destacando de forma especial los numerosos avances en el campo de los productos lácteos, debido a la facilidad de incorporación o separación de ingredientes a su matriz.

La leche y los productos lácteos son una de las principales fuentes nutricionales en nuestra dieta, con un alto contenido en proteínas, calcio y vitaminas liposolubles (A, D y E). Actualmente se encuentran en el mercado leches fermentadas dirigidas a mejorar la microbiota intestinal y el estado inmunológico, así como otros productos lácteos con esteroides vegetales dirigidos a la reducción de los niveles sanguíneos de CHOL.

Las recomendaciones dietéticas actuales reconocen la contribución de la leche y de los productos lácteos a una dieta saludable, ya que su consumo implica elevar los niveles de múltiples nutrientes (calcio, potasio, vitamina A, vitamina D, etc.).

A la vista de los resultados científicos actuales en los que se ha demostrado el papel preventivo de diferentes FA y CLA procedentes de la grasa láctea en la pérdida de peso y la disminución del desarrollo de CVD (Mozzaffarian *et al.*, 2014; Astrup *et al.*, 2016), la imagen negativa de la grasa láctea se está viendo atenuada, detectándose un creciente interés en los lípidos lácteos como fuente de ingredientes bioactivos y confirmándose la no asociación del consumo de lácteos e incremento del CVR en individuos adultos sanos (Juárez *et al.*, 2015).

La mayoría de las modificaciones en la composición de estos productos se realiza durante el procesado industrial. Sin embargo, son numerosos los estudios recientes que justifican la necesidad de enriquecer la leche y los productos lácteos con aceites vegetales o semillas ricas en PUFA a través de la suplementación de la dieta de los animales (Gómez-Cortés *et al.*, 2009; Martínez-Martín *et al.*, 2011).

Por otro lado, los ensayos clínicos controlados y aleatorizados constituyen el mejor estándar de calidad para valorar la eficacia de la ingesta de alimentos funcionales en la prevención de enfermedades crónicas, y constituyen la pieza final de la evidencia científica para determinar el efecto, la eficacia y la seguridad de un alimento funcional. Esto ha generado un gran interés en la realización de estudios clínicos en humanos para evaluar así el efecto de las diferentes estrategias de enriquecimiento natural de la leche y de los productos lácteos con ALA y CLA en el perfil lipídico sanguíneo y los marcadores de CVR (Parodi, 2009; Legrand *et al.*, 2010; Mozzaffarian *et al.*, 2014; Astrup *et al.*, 2016).

La estrategia que se aborda en el presente trabajo se encuentra estructurada en dos partes: 1) el desarrollo de un nuevo concepto de queso de cabra a partir de leche con un perfil lipídico mejorado de manera natural, sin la necesidad de adicionar o modificar la composición del producto lácteo, gracias a la alimentación del rumiante con complementos nutricionales integrados en el pienso, obteniendo así un incremento de los FA con propiedades antiateroscleróticas y antiinflamatorias; 2) realización de un ensayo clínico de intervención nutricional en sujetos con sobrepeso, obesidad y el perfil lipídico alterado para determinar el efecto del consumo del queso sobre diferentes marcadores antropométricos, de salud y de inflamación.

## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares suponen la primera causa de mortalidad a nivel mundial, y en España suponen el 30% de las defunciones, por encima de otras enfermedades como el cáncer y las enfermedades respiratorias. Las causas parecen asociarse a los nuevos estilos de vida de la sociedad: un elevado nivel de estrés, dieta desequilibrada (bajo consumo de alimentos frescos como frutas y verduras y exceso de alimentos ultraprocesados), y malos hábitos como el consumo de alcohol, el tabaco y el sedentarismo. Las recomendaciones nutricionales de las últimas décadas se han centrado, sobre todo, en la reducción del consumo de grasa saturada, principalmente de grasa láctea, por lo que se ha desaconsejado su consumo de forma indiscriminada al ser considerada indebidamente como una fuente innecesaria de calorías en la dieta. Su ingesta se ha asociado a un aumento de los factores de riesgo cardiovascular, como son la alteración del perfil lipídico sanguíneo (aumento drástico de triglicéridos y de LDL, y reducción de HDL), vinculados de manera directa con las enfermedades más prevalentes como la obesidad, la diabetes, la hipertensión y la hipercolesterolemia.

Sin embargo, en los últimos años han sido muchos los estudios científicos que han evidenciado la importancia del consumo de productos lácteos elaborados a partir de leche entera, ya que la grasa láctea es una fuente compleja de ácidos grasos de gran importancia biológica, como es el caso de los lípidos bioactivos (ácidos grasos de cadena corta como el ácido butírico, el ácido linoleico conjugado (CLA) y otros compuestos como fosfolípidos y esfingomielina, etc.). Así, numerosos trabajos de investigación recientes que incluyen metaanálisis, han evidenciado que la ingesta de productos lácteos elaborados a partir de leche entera parece tener un efecto neutro o inversamente asociado al riesgo cardiovascular en individuos sanos. Se ha demostrado que el consumo de productos lácteos elaborados a partir de leche entera no sólo no aumenta el riesgo cardiovascular, sino que pueden mejorar el perfil lipídico al reducir los niveles plasmáticos de LDL, ejercer un efecto antiinflamatorio, así como inhibir la adipogénesis y la lipogénesis y mejorar la tolerancia a la glucosa.

No obstante, la industria láctea ha venido desarrollando de manera muy activa nuevos productos funcionales para adaptarse a las nuevas recomendaciones y tendencias de la población, que demanda nuevos productos lácteos más saludables. En este sentido, durante estos últimos años, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo distintos estudios científicos en colaboración con industrias lácteas, que se han centrado en la modificación, de manera natural, de la composición lipídica de la leche y de los productos lácteos para mejorar su calidad nutricional sin afectar a sus propiedades sensoriales y conseguir productos con potenciales beneficios para la salud.

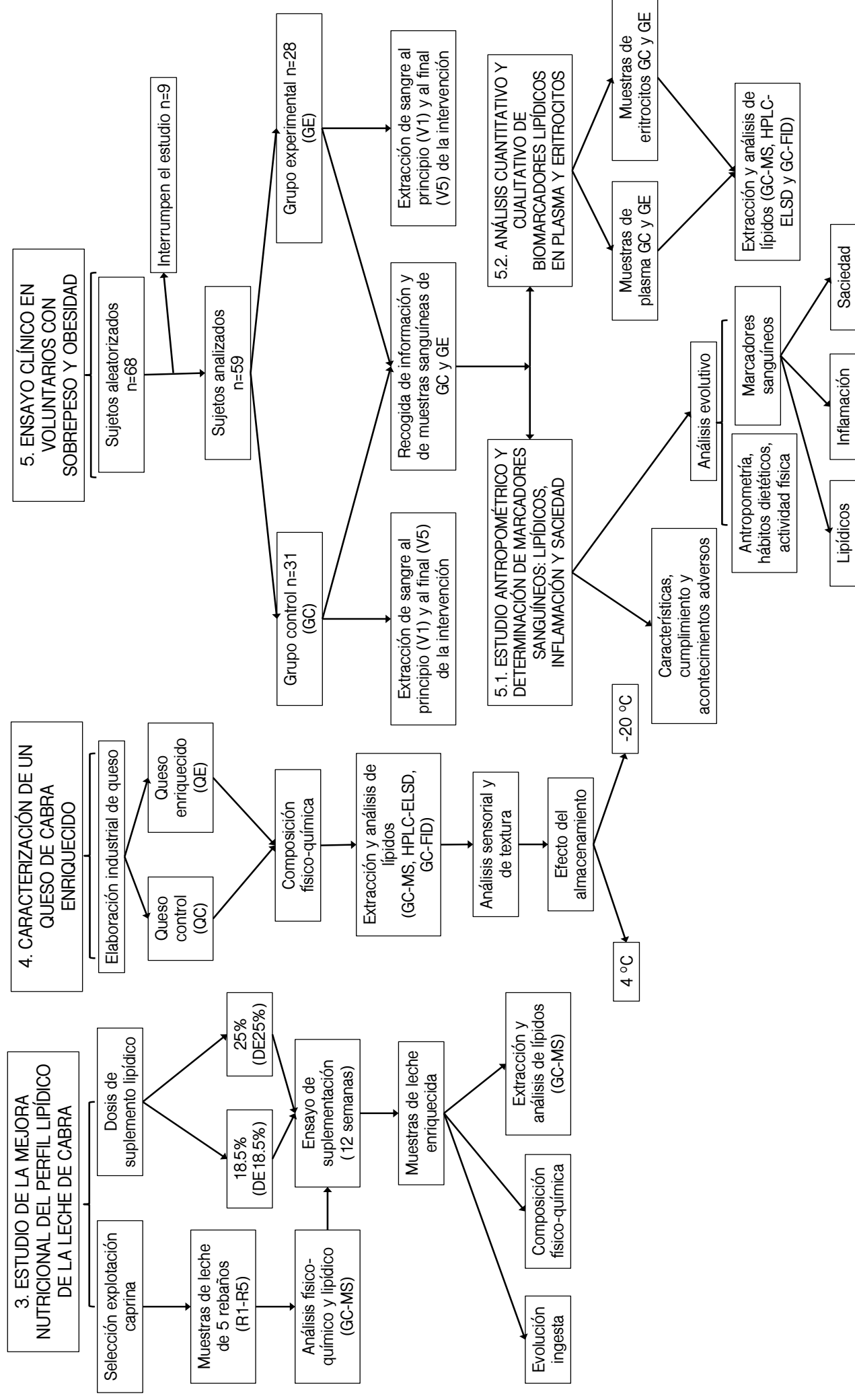


Teniendo en cuenta los antecedentes previamente descritos, la presente Tesis Doctoral tiene como **objetivo general**:

La evaluación del efecto de la ingesta de un queso enriquecido de manera natural en ácidos grasos omega-3 y CLA mediante un ensayo clínico de intervención nutricional en voluntarios con sobrepeso, obesidad y el perfil lipídico alterado (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, etc.).

Para la consecución de dicho objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

1. Obtención de una leche de cabra con el perfil lipídico mejorado de manera natural mediante la reducción del contenido en ácidos grasos saturados y el aumento de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y CLA.
2. Caracterización físico-química, lipídica, organoléptica y nutricional de un queso de cabra enriquecido, elaborado industrialmente a partir de la leche seleccionada.
3. Evaluación del efecto de la ingesta del queso enriquecido en lípidos saludables en voluntarios con sobrepeso y obesidad mediante un ensayo clínico de intervención nutricional, prospectivo, aleatorizado, paralelo, doble ciego y controlado.
  - 3.1. Estudio antropométrico y determinación de marcadores sanguíneos de riesgo cardiovascular, de inflamación y de saciedad.
  - 3.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de los biomarcadores lipídicos de riesgo cardiovascular en plasma y en eritrocitos.



### 3. ESTUDIO DE LA MEJORA NUTRICIONAL DEL PERFIL LIPÍDICO DE LA LECHE DE CABRA

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La leche de cabra ocupa el cuarto lugar en términos de producción láctea mundial, seguida de la leche de vaca, de búfala y de oveja. En España, Andalucía es el mayor productor de leche de cabra seguido por las regiones de Castilla-La Mancha, Murcia y Canarias. En cuanto a censo estimado y producción, la principal raza caprina en nuestro país es la Murciano-Granadina, una raza de origen mediterráneo que posee un elevado rendimiento quesero y una gran capacidad de adaptación (MAPAMA, 2015). La intensificación de la producción caprina de los últimos cincuenta años ha hecho que se produzca un aumento en el contenido de SFA en la leche y una reducción de los PUFA, debido principalmente a las bajas ingestas de pasto (Luna, 2006). Esta situación representa un problema, dado que durante décadas las autoridades sanitarias han recomendado una disminución del consumo de grasa láctea debido a la asociación entre una elevada concentración de SFA y CHOL con un mayor riesgo de sufrir enfermedades crónicas (Siri-Tarino *et al.*, 2010). Por otro lado, el aumento actual del consumo de leche y productos lácteos desnatados en la dieta puede dar lugar a una reducción en la ingesta de compuestos bioactivos de interés presentes en la fracción lipídica de la leche y que poseen una significativa actividad biológica en relación con la salud humana.

Por lo tanto, uno de los retos a los que se enfrenta el sector lácteo es la búsqueda de alternativas que permitan modificar la composición lipídica de la leche y de los productos lácteos mejorando sus propiedades nutricionales y funcionales sin alterar sus cualidades tecnológicas y sensoriales, que son factores clave que determinan la elección de productos por parte del consumidor. La nutrición de los rumiantes es para los ganaderos una forma natural y económica de modular la composición de los FA de la leche, en particular mediante la adición de suplementos lipídicos a la dieta (Chilliard y Ferlay, 2004). Especialmente los PUFA de origen vegetal han demostrado ser especialmente eficaces en la modificación del perfil lipídico de la leche al disminuir los niveles de los FA asociados a factores de CVR (Sanz-Sampelayo *et al.*, 2007; Gómez-Cortés, 2009; Gassi *et al.*, 2012).

En el año 2008, la empresa Lodyn S.L., en colaboración con el IRTA y nuestro grupo del CSIC, desarrollaron un suplemento para la alimentación de rumiantes (Lodyn Milk®) consistente en una “combinación extrusionada” de una mezcla de semillas de lino, salvado de trigo y harina de girasol (Bach *et al.*, 2011). Varios estudios han demostrado la eficacia de dicho suplemento, que utilizado como un ingrediente más de la dieta, modifica la síntesis lipídica en el rumiante que produce, de manera natural, una leche con alto contenido en FA n3 y CLA sin que se vean

afectados los demás componentes ni sus características organolépticas (Luna *et al.*, 2008a; Luna *et al.*, 2008b; Luna *et al.*, 2009; Gómez-Cortés *et al.*, 2009; Bach *et al.*, 2011).

En este contexto, el objetivo de este estudio fue la obtención de manera natural de una leche de cabra con el perfil lipídico nutricionalmente mejorado y rica en ingredientes bioactivos. Como estrategia para lograr dicho objetivo, se planteó el desarrollo de un pienso que, al incorporar una dosis óptima del suplemento Lodyn Milk<sup>®</sup> permitiera, bajo condiciones reales de manejo de la explotación, obtener una leche de calidad nutricional mejorada a través de la propia alimentación del ganado caprino, sin la necesidad de modificar de manera industrial el producto lácteo mediante la adición, la eliminación o la modificación de alguno sus componentes.

### **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.2.1. Selección de la explotación caprina participante en el estudio**

Durante un período de 3 semanas entre septiembre y octubre, se llevó a cabo el análisis de la leche procedente de 5 explotaciones de cabras (R1-R5) de raza Murciano-Granadina localizadas en la región de Murcia (España). Así, dos veces por semana, se recogieron muestras de leche de los tanques de almacenamiento de cada explotación para analizar tanto su composición global (**Tabla 3.1**) como su perfil lipídico (**Tabla 3.2**). El objetivo de esta fase inicial de cribado fue el de seleccionar aquel rebaño que produjera una leche cuya fracción lipídica presentara unas características más saludables para participar en el estudio de suplementación que se desarrolló posteriormente. Para ello, se recogieron semanalmente muestras de leche cruda a granel procedente de los tanques de almacenamiento de cada una de las cinco explotaciones que fueron enviadas al CIAL para su posterior análisis.

#### **3.2.2. Mejora de la calidad nutricional de la leche**

##### **3.2.2.1. Diseño de un concentrado que integre el suplemento Lodyn Milk<sup>®</sup> en su composición**

La empresa Lodyn S.L. fue la encargada de formular un pienso en el que el suplemento Lodyn Milk<sup>®</sup> se integrara como un ingrediente más del concentrado. Esto representó una novedad respecto a los estudios previos realizados ya que, hasta ese momento, dicho suplemento únicamente se había incorporado en la dieta de los rumiantes en forma de harinas. La cabra es uno de los rumiantes más exigentes en cuanto a la alimentación y selecciona tanto el forraje como el pienso que ingiere,

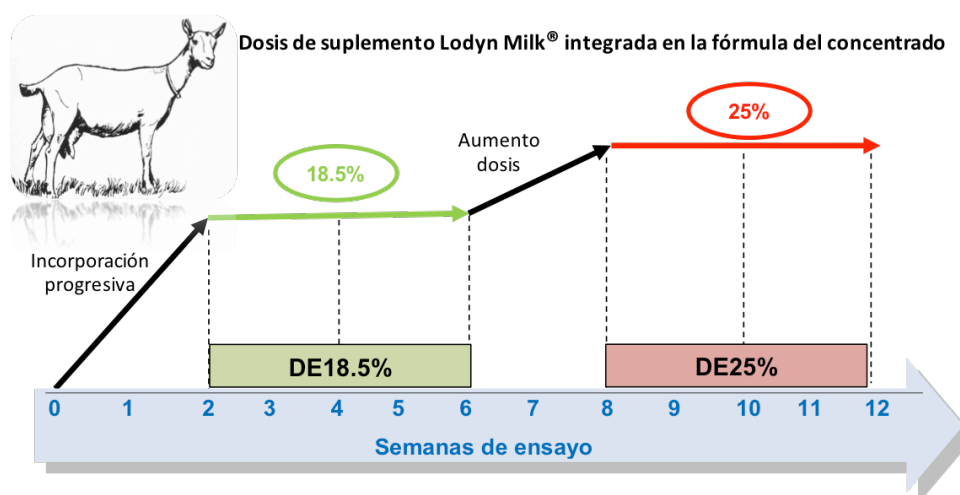
siendo capaz de relacionar el olor, el sabor, la textura y la presentación de los alimentos con la respuesta positiva o negativa que éstos generan posteriormente en su organismo.

Por tanto, dada esta exigencia particular del ganado caprino, la empresa Lodyn S.L. realizó estudios tanto de la composición como de la dosis óptima del suplemento a incorporar, de forma que el pienso no sólo estuviera específicamente desarrollado para satisfacer los requerimientos nutricionales de las cabras, sino que presentara unas propiedades organolépticas adecuadas, evitando así los posibles problemas de rechazo. Se optó por el extrusionado del suplemento en combinación con el pienso habitual, puesto que estudios previos habían demostrado que cuando la semilla de lino se procesa de esta manera se generan mayores aumentos en los contenidos de FA n3 y CLA en leche (Gómez-Cortés, 2009). Finalmente, con el objetivo de obtener una leche de cabra enriquecida de forma natural en ingredientes bioactivos, se ensayaron 2 formulaciones del pienso incorporando dos dosis diferentes del suplemento Lodyn Milk®: 18.5% (DE18.5%) y 25% (DE25%) del total del concentrado.

#### **3.2.2.2. Ensayo de suplementación realizado con el rebaño R1**

Como se puede observar en la **Figura 3.1**, el ensayo de suplementación de la dieta de las cabras se llevó a cabo durante un período de 12 semanas (de noviembre a enero). Para ello, el rebaño seleccionado en la fase anterior del estudio (R1) se dividió en 2 lotes de 300 cabras cada uno, el lote control (LC) y el lote experimental (LE). Ambos lotes, formados por cabras con similar rango y estado de lactación, se mantuvieron bajo condiciones reales de producción en una explotación ganadera de la región de Murcia (España).

La dieta control (DC) y las dietas experimentales (DE18.5% y DE25%) fueron formuladas para ser isoenergéticas e isoproteicas con el mismo aporte de fibra y de idéntica procedencia. Durante el período de realización del ensayo, la proporción de la relación forraje:concentrado en la dieta fue 53:47 tanto en DC como en DE18.5% y DE25%. El forraje estaba constituido por alfalfa ( $1.10\text{kg}\cdot\text{cabra}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ) y heno de avena ( $0.35\text{ kg}\cdot\text{cabra}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ). En cuanto al concentrado ( $1.3\text{ kg}\cdot\text{cabra}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ), se empleó un pienso específico para el ganado caprino cuya composición consistía en una mezcla equilibrada de maíz, cebada, soja 44, salvado, trigo, corrector vitamínico mineral, sal, bicarbonato y bicarbonato cálcico (**Tabla 3.3**).



**Figura 3.1.** Línea temporal del ensayo de suplementación de la dieta de las cabras realizado en la explotación R1. Incorporación progresiva del concentrado con el suplemento Lodyn Milk® integrado en su fórmula: dosis de 18.5% (DE18.5%) (semanas 0-6) y dosis de 25% (DE25%) (semanas 6-12).

El LC consumió esta dieta de referencia (DC), mientras que la composición del pienso concentrado se modificó para la DE18.5% y DE25% incluyendo el suplemento Lodyn Milk® en una proporción del 18.5% y 25% respectivamente, recalculándose la cantidad del resto de los componentes presentes en el pienso.

En la **Figura 3.1** se recoge de manera esquemática el desarrollo temporal del ensayo de suplementación realizado con las cabras del LE. Durante las 2 primeras semanas de ensayo, el pienso normal fue progresivamente sustituido por el pienso que incluía en su composición un 18.5% de suplemento Lodyn Milk®, permitiendo una adaptación gradual de los animales del LE a la nueva dieta.

Una vez la ingesta se estabilizó, se mantuvieron las condiciones experimentales durante las 4 semanas siguientes. Durante este período, se llevaron a cabo dos elaboraciones industriales de queso de cabra enriquecido, tal y como se describirá en el Capítulo 4. A partir de la semana 6, se empezó a introducir gradualmente en la dieta del LE un concentrado que llevaba incorporado en su composición un 25% de suplemento Lodyn Milk®. Transcurrido un período de adaptación de 2 semanas y una vez estabilizada la ingesta, las cabras se mantuvieron en las nuevas condiciones experimentales durante las siguientes cuatro semanas hasta finalizar el ensayo.

La empresa Lodyn S.L. fue la encargada del suministro del suplemento a la explotación ganadera participante, así como de la realización de los controles y el seguimiento de dicha explotación, con el fin de detectar posibles variaciones en el

nivel de producción de leche, patologías o problemas de ingesta achacables a la inclusión del suplemento en la dieta del ganado.

### **3.2.2.3. Composición físico-química**

Los contenidos de grasa, proteína, lactosa y extracto seco de las leches fueron determinados mediante espectroscopía de infrarrojo utilizando un equipo MilkoScan FT 6000 (Foss Electric España S.A., Barcelona, España) en el Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla La Mancha (LILCAM).

### **3.2.2.4. Extracción de la grasa de las muestras lácteas**

La extracción de la grasa de leche se llevó a cabo mediante un método rápido basado en una doble centrifugación (Luna *et al.*, 2005). Los extractos lipídicos obtenidos se recogieron en viales de vidrio color topacio y, tras ser tratados con una corriente de nitrógeno, se conservaron a -20 °C hasta el momento de su análisis.

### **3.2.2.5. Análisis de ácidos grasos metil ésteres (FAME) de la fracción lipídica**

El análisis de los FAME de la leche se realizó mediante dos métodos cromatográficos diferentes. Debido al elevado número de muestras analizadas durante el método de cribado y en la selección de las explotaciones caprinas, se empleó un análisis rápido en cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), utilizando una columna capilar de sílice fundida de VF-23ms (30 m x 0.25 i.d. x 0.25 µm, Varian, Middelburg, Países Bajos) en un equipo Clarus 500 (Perkin Elmer). Después de la inyección, la columna se mantuvo a 120 °C durante 1 min y se programó un aumento de la temperatura de 10 °C/min hasta 140 °C, seguido de otro incremento de 15 °C/min hasta 180 °C, y por último de 5 °C/min hasta 240 °C, donde se mantuvo durante 3 min. El helio fue el gas portador con una presión de entrada en la columna de 15 psig y una relación de split de 1:20. El volumen de la inyección fue de 0.5 µl, siendo 35 min el tiempo total del análisis.

Durante el ensayo de suplementación, para una identificación más exhaustiva de los FA, el análisis cromatográfico de los FAME se realizó en un equipo GC-FID (Agilent 6890N, Palo Alto, California, Estados Unidos) provisto de divisor de flujo siguiendo el procedimiento descrito por Castro-Gómez *et al.* (2014). La separación de los FA se llevó a cabo en una columna de cianopropil-siloxano CP-Sil 88 (100 mm x 0.25 mm i.d. x 0.2 µm, Chrompack, Middelburg, Países Bajos) previa derivatización de



la grasa láctea siguiendo el procedimiento de referencia (ISO-IDF 2002). Se utilizó helio como gas portador con una presión de entrada en la columna de 30 psig y una relación de split de 1:20. El volumen de inyección fue de 0.5 µl, siendo 105 min el tiempo total de análisis. Para la identificación de los picos, se utilizó la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, MD). Los factores de respuesta se calcularon utilizando la grasa de referencia BCR-164 (Fedelco Inc., Madrid, España) y se usó la tritridecanoína como patrón interno (200 µl; 1.3 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos). Los análisis se llevaron a cabo por triplicado mientras que los factores de respuesta se calcularon respecto a la BCR-164 (Comité Europeo; Bruselas, Bélgica).

#### **3.2.2.6. Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SD. El análisis estadístico de la diferencia se llevó a cabo mediante una prueba no paramétrica (U-Mann Whitney). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS (SPSS 20.00 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL). El criterio de significación fue  $p < 0.05$  para todas las comparaciones.

### **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.3.1. Selección de la explotación ganadera participante en el estudio**

Los resultados del análisis físico-químico de las muestras de leche procedentes de los cinco rebaños estudiados (**Tabla 3.1**) no revelaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ellos, hallándose las concentraciones de grasa, proteína, extracto seco y lactosa dentro de los rangos descritos como normales para la leche de cabra. El rebaño R1 presentó los contenidos de grasa y de proteína más elevados (5.72% y 3.80% respectivamente), mientras que los valores de R4 fueron ligeramente inferiores a la media (4.63% de grasa y 3.37% de proteína).

En cuanto al perfil lipídico de las muestras de leche de los distintos rebaños estudiados que se muestran en la **Tabla 3.2**, se corresponde en general con el descrito anteriormente para la leche de cabra (Alonso *et al.*, 1999; Fontecha *et al.*, 2010; Castro-Gómez *et al.*, 2014). Así, el contenido total de SFA osciló entre un 64.4% (R1) y un 68.1% (R4) del contenido total de FA, observándose notables diferencias en la concentración de ácido palmítico (C16:0), el compuesto mayoritario, cuya concentración máxima de un 27% se encontró en R1, mientras que en R5 fue el contenido más bajo y sólo supuso un 23.5% del total de FA. En la mayoría de los

rebaños la leche presentó un contenido de ácido láurico (C12:0) en torno al 3%, mientras que los niveles de ácido mirístico (C14:0) representaron entre el 8.3% y el 9% del total de FA. También se detectó una notable presencia de ácido esteárico (C18:0) en todas las muestras, aunque su contenido fue muy variable, siendo la concentración en R4 casi el doble que la hallada en R1 (13% vs. 7.3% respectivamente).

**Tabla 3.1.** Análisis físico-químico de la leche de cabra procedente de los cinco rebaños (R1-R5) participantes en la etapa inicial del proyecto. Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Composición (%)	Explotaciones caprinas				
	R1	R2	R3	R4	R5
Grasa	5.72 $\pm$ 0.18	5.70 $\pm$ 0.64	4.99 $\pm$ 0.49	4.63 $\pm$ 0.13	5.64 $\pm$ 0.23
Proteína	3.80 $\pm$ 0.07	3.60 $\pm$ 0.25	3.70 $\pm$ 0.08	3.37 $\pm$ 0.11	3.75 $\pm$ 0.42
Extracto seco	14.99 $\pm$ 0.31	14.76 $\pm$ 1.20	14.13 $\pm$ 0.71	13.48 $\pm$ 0.28	14.96 $\pm$ 0.42
Lactosa	4.48 $\pm$ 0.04	4.48 $\pm$ 0.01	4.56 $\pm$ 0.03	4.72 $\pm$ 0.02	4.61 $\pm$ 0.01

\*Los valores dentro de una misma fila difieren significativamente  $p < 0.05$ .

En cuanto a los SCFA, el ácido butírico (C4:0), el ácido caproico (C6:0) y el ácido caprílico (C8:0) se encontraban presentes en cantidades similares (2-3% del total de FA) en todas las muestras analizadas. Sin embargo, la concentración de ácido cáprico (C10:0) alcanzó valores próximos al 9% del total de FA, valores habituales en la leche de cabra (Alonso *et al.*, 1999; Fontecha *et al.*, 2010).

Respecto al contenido total de MUFA, éste supuso alrededor de 29-30% del total de FA en todos los rebaños excepto en R4 (26.8%). En todos los casos, el ácido oleico (*cis*-9 C18:1) fue el FA mayoritario, detectándose valores superiores al 20%. Aunque en la leche de todas las explotaciones analizadas el contenido total de los TFA del C18:1 se hallaba dentro del rango descrito como normal para la grasa láctea (2-6% del total de FA), cabe destacar el elevado contenido de TFA (5.3%) presente en la leche procedente de R1. Dentro de los TFA, el TVA fue el isómero mayoritario en todas las muestras, aunque su concentración varió significativamente ( $p < 0.05$ ) entre rebaños (0.8% en R4 vs. 2.3% en R1) debido probablemente a las diferencias en el manejo de las explotaciones y al tipo de alimentación utilizada en cada caso.

**Tabla 3.2.** Perfil lipídico de leche de cabra procedente de los cinco rebaños participantes en la etapa inicial del proyecto (% del total de FA). Valores expresados como media  $\pm$  SD.

FA (%)	Explotaciones caprinas				
	R1	R2	R3	R4	R5
C4:0	2.07 $\pm$ 0.08	2.12 $\pm$ 0.05	1.95 $\pm$ 0.07	2.18 $\pm$ 0.04	2.66 $\pm$ 0.06
C6:0	2.40 $\pm$ 0.16	2.36 $\pm$ 0.04	2.26 $\pm$ 0.07	2.46 $\pm$ 0.01	2.68 $\pm$ 0.01
C8:0	2.52 $\pm$ 0.11	2.57 $\pm$ 0.05	2.51 $\pm$ 0.10	2.70 $\pm$ 0.01	2.80 $\pm$ 0.02
C10:0	8.67 $\pm$ 0.34	9.08 $\pm$ 0.14	8.63 $\pm$ 0.23	8.66 $\pm$ 0.02	8.74 $\pm$ 0.11
C12:0	3.25 $\pm$ 0.05	3.54 $\pm$ 0.04	3.32 $\pm$ 0.11	3.07 $\pm$ 0.01	3.15 $\pm$ 0.03
C14:0	8.32 $\pm$ 0.08	9.02 $\pm$ 0.01	8.55 $\pm$ 0.22	8.74 $\pm$ 0.02	8.94 $\pm$ 0.10
C16:0	26.97 $\pm$ 0.61	25.73 $\pm$ 0.25	24.03 $\pm$ 0.01	23.94 $\pm$ 0.13	23.54 $\pm$ 0.03
C18:0	7.31 $\pm$ 0.02	9.90 $\pm$ 0.12	10.40 $\pm$ 0.19	12.93 $\pm$ 0.07	10.63 $\pm$ 0.03
<i>cis</i> -9 C14:1	0.16 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.04
<i>cis</i> -9 C16:1	0.89 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.01	0.76 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.04
<i>cis</i> -9 C18:1	20.30 $\pm$ 0.11	23.20 $\pm$ 0.26	23.30 $\pm$ 0.33	21.70 $\pm$ 0.02	22.10 $\pm$ 0.06
$\Sigma$ <i>cis</i> C18:1	21.40 $\pm$ 0.11	24.40 $\pm$ 0.15	24.80 $\pm$ 0.25	22.90 $\pm$ 0.01	23.50 $\pm$ 0.09
<i>trans</i> -10 C18:1	1.31 $\pm$ 0.20	0.22 $\pm$ 0.31	0.60 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.51
TVA	2.27 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.24	1.63 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.03	2.03 $\pm$ 0.39
$\Sigma$ <i>trans</i> C18:1	5.26 $\pm$ 0.01	2.13 $\pm$ 0.06	3.62 $\pm$ 0.01	1.94 $\pm$ 0.05	3.64 $\pm$ 0.22
<i>t11, c15</i> C18:2	0.10 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.04
LA	4.68 $\pm$ 0.06	2.48 $\pm$ 0.04	3.20 $\pm$ 0.02	3.78 $\pm$ 0.01	3.58 $\pm$ 0.06
ALA	0.21 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01
RA	1.05 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.02	0.58 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.01
AA	0.17 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.04
$\Sigma$ SFA	64.40 $\pm$ 0.09	67.70 $\pm$ 0.04	65.00 $\pm$ 0.47	68.10 $\pm$ 0.09	66.00 $\pm$ 0.12
$\Sigma$ MUFA	28.70 $\pm$ 0.03	28.80 $\pm$ 0.01	30.30 $\pm$ 0.24	26.80 $\pm$ 0.01	29.10 $\pm$ 0.30
$\Sigma$ PUFA	6.90 $\pm$ 0.12	3.50 $\pm$ 0.03	4.70 $\pm$ 4.28	5.10 $\pm$ 0.09	4.90 $\pm$ 0.23
Total CLA	1.15 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.01	0.67 $\pm$ 0.22	0.37 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.01
Total n6	4.95 $\pm$ 0.03	2.63 $\pm$ 0.02	3.35 $\pm$ 0.06	4.04 $\pm$ 0.03	3.84 $\pm$ 0.09
Total n3	0.37 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.11
n6/n3	13.30 $\pm$ 0.25	14.80 $\pm$ 2.43	12.30 $\pm$ 0.10	13.60 $\pm$ 1.72	11.80 $\pm$ 3.61
$\Sigma$ SCFA	16.10 $\pm$ 0.80	16.70 $\pm$ 0.43	15.80 $\pm$ 0.47	16.50 $\pm$ 0.18	17.20 $\pm$ 0.13
$\Sigma$ MCFA	13.00 $\pm$ 0.18	14.40 $\pm$ 0.02	13.50 $\pm$ 0.38	13.50 $\pm$ 0.05	13.40 $\pm$ 0.05
$\Sigma$ LCFA	70.90 $\pm$ 0.62	68.90 $\pm$ 0.45	70.70 $\pm$ 0.83	70.00 $\pm$ 0.13	69.40 $\pm$ 0.03

SCFA ácidos grasos de cadena corta (C4:0-C10:0); MCFA ácidos grasos de cadena media (C12:0-C14:0); LCFA ácidos grasos de cadena larga ( $\geq$ C16:0); *t11, c15* C18:2: *trans*-11, *cis*-15 C18:2.

En general, los niveles de PUFA presentes en las muestras analizadas supusieron entre el 4% y el 5% del total de FA, valores que se encuentran dentro de los rangos descritos en la bibliografía para la leche de cabra (Castro-Gómez *et al.*, 2014). Sin embargo, la leche de R1 presentó, de forma natural, una concentración de PUFA próxima al 7%. LA fue el PUFA mayoritario en todos los casos y, a excepción de R2, donde no alcanzó el 3% del total de FA, los niveles de LA en el resto de los rebaños estuvieron próximos al 4-5%. En todas las muestras analizadas, los niveles de ALA

fueron relativamente bajos con valores próximos a 0.2%. En relación al contenido de RA, el principal isómero del CLA, se hallaron diferencias significativas entre las muestras de los diferentes rebaños, siendo en general su contenido inferior al 0.6%, a excepción de R1, cuya leche presentaba una concentración de RA próxima al 1% del total de FA.

El R1 fue finalmente seleccionado para su participación en el ensayo de suplementación, teniendo en cuenta que, entre las explotaciones estudiadas, fue el rebaño que de forma natural produjo la leche con un perfil lipídico más saludable. Así, se valoró de manera positiva su elevado contenido en PUFA (7%), en particular de RA y de LA, un FA esencial que no puede ser sintetizado por el organismo, por lo que debe ser obtenido a partir de la dieta. Igualmente, se tuvo en consideración la mayor presencia de TVA en la leche del rebaño seleccionado.

### **3.3.2. Mejora nutricional del perfil lipídico de la leche de cabra. Ensayo de suplementación**

#### **3.3.2.1. Evolución de la ingesta del pienso por parte de las cabras durante el ensayo de suplementación**

A lo largo del ensayo, la empresa Lodyn S.L. fue la encargada de evaluar *in situ* la condición corporal de los rumiantes participantes en el estudio y los posibles cambios en el rendimiento lechero medio, no observándose variaciones reseñables como consecuencia del cambio de dieta. Respecto a la ingesta de la ración que llevaba incorporado el suplemento, si bien no se detectaron problemas cuando se utilizaba el pienso DE18.5%, se registraron anomalías cuando se incrementó a 25% la dosis del suplemento.

La inclusión de una dosis del 25% del suplemento Lodyn Milk® llevó implícito un incremento del contenido de grasa en el pienso (**Tabla 3.3**), lo que probablemente condujo a una variación de las características organolépticas del mismo, provocando un cierto rechazo por parte de las cabras, que dejaron de comer parte de la ración de pienso que se les suministró.

**Tabla 3.3.** Ingredientes, composición nutricional y perfil lipídico de la dieta control (DC) y de las dietas experimentales en las que el concentrado lleva incorporado en su composición el suplemento Lodyn Milk® en una dosis de 18.5% (DE18.5%) o del 25% (DE25%).

<i>Ingredientes</i>	DC	DE18.5%	DE25%
Relación Forraje:concentrado	53:47:00	53:47:00	53:47:00
Alfalfa (kg/día)	1.1	1.1	1.1
Heno de avena (kg/día)	0.35	0.35	0.35
Concentrado (kg/día) <sup>1</sup>	1.3	1.3	1.3
Suplemento Lodyn Milk® (%)	0	18.5	25
Total ingesta (Kg/día)	2.75	2.75	2.75
<i>Composición nutricional</i>			
Humedad (%)	10.24	10.07	10.21
Materia seca, DM (%)	89.76	89.93	89.79
Cenizas totales (% de DM)	8.14	6.52	6.35
Proteína bruta (% de DM)	16.12	18.47	18.7
Fibra Bruta (% de DM)	6.53	9.8	8.07
Grasa bruta % (p/p)	6.45	8.52	9.73
<i>Perfil lipídico</i> <sup>2</sup>			
SFA	28.03	16.02	15.72
MUFA	31.18	26.43	24.97
PUFA	40.8	57.56	59.32
UFA	71.98	83.99	84.29
Ácido láurico,	0.06	0.01	0.01
Ácido mirístico, %	0.36	0.1	0.1
Ácido palmítico, %	23.2	10	9.97
Ácido palmitoleico, %	0.26	0.23	0.35
Ácido esteárico, %	3.32	4.72	4.49
Ácido oleico, %	30	25.5	23.9
Ácido linoleico, %	36.7	27.3	25
Ácido α-linolénico, %	3.42	29.9	34

<sup>1</sup>Composición del concentrado: mezcla de maíz, cebada, soja 44, salvado de trigo, corrector vitamínico mineral, sal, bicarbonato y bicarbonato cálcico.

<sup>2</sup>Expresado como: g de FA/100 g de grasa.

### 3.3.2.2. Evolución de la composición físico-química de la leche durante el ensayo de suplementación

En la **Tabla 3.4** se muestra la evolución temporal de la composición físico-química de la leche procedente de R1 tras incorporar en la dieta el concentrado que incluía el suplemento Lodyn Milk®. Durante las 2 primeras de ensayo se fue introduciendo progresivamente el pienso DE18.5% y, una vez que la ingesta se hubo estabilizado, los animales se mantuvieron en esas condiciones hasta la semana 6. La incorporación del suplemento lipídico a la dieta de los rumiantes provocó, tal y como se ha

observado en otros estudios (Mele *et al.*, 2009; Chilliard y Ferlay, 2004), un ligero pero progresivo incremento de la cantidad de grasa total y extracto seco. Una vez estabilizada la ingesta, no se observaron cambios significativos en la composición de la leche entre las semanas 4 y 6. Posteriormente, cuando se incluyó el concentrado con una dosis superior del suplemento (DE25%), se produjo un ligero pero progresivo incremento en el contenido de grasa, proteínas y extracto seco (MS) de la leche obtenida hasta la semana 10, tal y como se observa en la **Tabla 3.4**. En la semana 12, sin embargo, se observó un acusado incremento en todos los parámetros, alcanzándose concentraciones de 7.2%, 4.7% y 17.4% para grasa, proteína y extracto seco, respectivamente. Dichos cambios fueron significativos si se comparan con los valores de la leche obtenida de las cabras alimentadas con la DC y con la DE18.5% ( $p < 0.05$ ), pero también respecto a los datos correspondientes a la semana 10, cuando R1 ya llevaba 2 semanas ingiriendo pienso DE25%.

**Tabla 3.4.** Evolución temporal de la composición físico-química de la leche de cabra procedente de R1 tras consumir el concentrado con dos dosis diferentes del suplemento Lodyn Milk®: 18.5% (DE18.5%) y 25% (DE25%). Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Comp <sup>1</sup>	DC	DE18.5%				DE25%	
	S0	S2	S4	S6	S8	S10	S12
Grasa	5.59 $\pm$ 0.01	5.85 $\pm$ 0.21	6.20 $\pm$ 0.08	6.22 $\pm$ 0.26	6.31 $\pm$ 0.13	6.42 $\pm$ 0.18	7.23 $\pm$ 0.68 *
Proteína	3.85 $\pm$ 0.04	3.75 $\pm$ 0.01	4.01 $\pm$ 0.03	3.78 $\pm$ 0.11	3.84 $\pm$ 0.08	3.88 $\pm$ 0.10	4.68 $\pm$ 0.12 *
MS	14.7 $\pm$ 0.32	15.21 $\pm$ 0.22	15.88 $\pm$ 0.12	15.49 $\pm$ 0.47	15.75 $\pm$ 0.10	15.98 $\pm$ 0.24	17.4 $\pm$ 0.40 *
Lactosa	4.48 $\pm$ 0.05	4.48 $\pm$ 0.05	4.92 $\pm$ 0.07	4.65 $\pm$ 0.13	4.64 $\pm$ 0.02	4.77 $\pm$ 0.06	4.76 $\pm$ 0.07

\*Los valores difieren significativamente respecto a los valores obtenidos en S0, S6 y S10  $p < 0.05$ ; <sup>1</sup>Comp: composición (g/100 g de leche); MS: extracto seco.

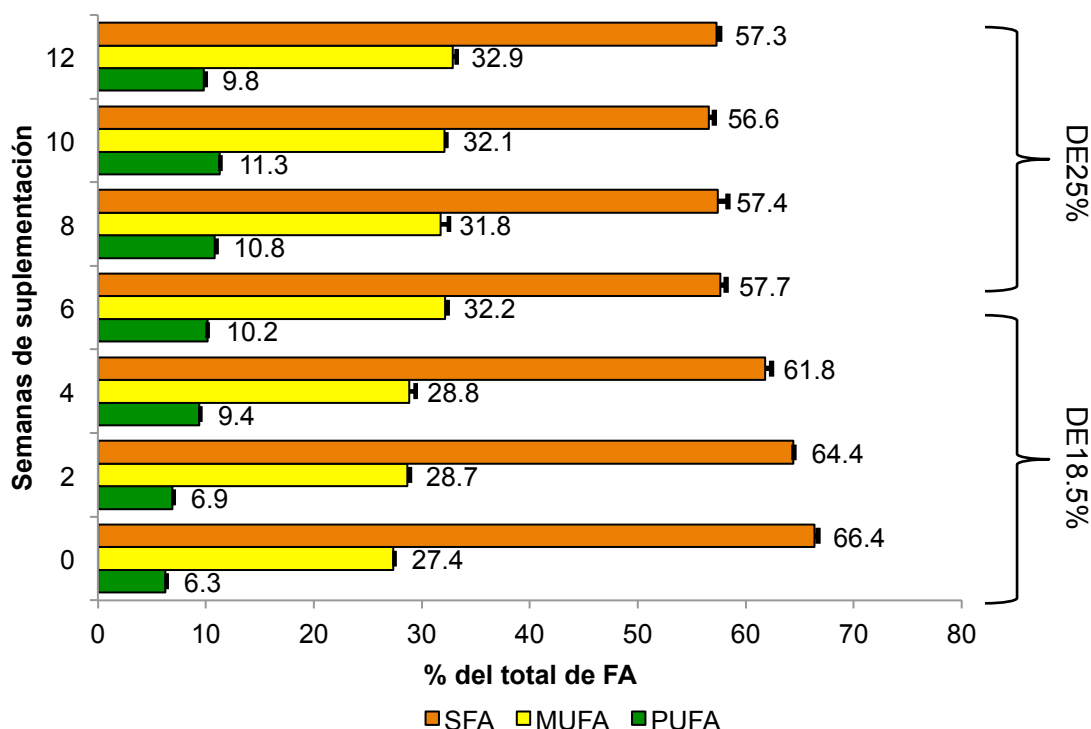
### 3.3.2.3. Evolución del perfil lipídico de la leche durante el ensayo de suplementación

El perfil lipídico de la leche de cabra procedente de R1 experimentó una mejora significativa desde el punto de vista nutricional como consecuencia de la incorporación del suplemento Lodyn Milk® en su dieta. Tal y como puede observarse en la **Figura 3.2**, a partir del momento en el que se incorpora el pienso con la dosis más baja del suplemento (DE18.5%), se produce una disminución progresiva del contenido de SFA, desde un 66.4% en las primeras dos semanas de ensayo hasta alcanzar un 57.6% en

la semana 6. La inclusión de una mayor dosis del suplemento (DE25%) no afectó significativamente a la presencia de SFA en la leche producida, permaneciendo en torno al 57% del total de FA hasta el final del ensayo. De forma simultánea, se observó un aumento gradual de la concentración de PUFA desde un 27.3% del total de FA (DC) hasta un 33% al final del ensayo, siendo esta tendencia más marcada durante las primeras 6 semanas (DE18.5%), ralentizándose el aumento de MUFA cuando se ensayó la dieta DE25%.

Por lo que respecta al contenido de PUFA, éste se vio afectado de manera significativa por la presencia del suplemento en la dieta. En la **Figura 3.2** se observa un claro aumento del contenido de PUFA hasta la semana 10 como consecuencia del incremento de la dosis del suplemento incorporada en el pienso. En contra de lo que cabría pensar, los datos correspondientes a la semana 12 no mostraron una mejora del perfil lipídico de la leche obtenida, sino una reducción del 15% del contenido de PUFA respecto a los valores obtenidos en la semana 10, alcanzando niveles similares (~10%) a los obtenidos cuando las cabras consumieron la dieta DE18.5%.

Este comportamiento anómalo en la semana 12 se observó igualmente en los niveles de FA n3 (**Figura 3.3A**), RA y TVA (**Figura 3.3B**), y parece estar justificado por la aparición de problemas en la ingesta por parte de los rumiantes cuando el concentrado llevaba incorporado un 25% del suplemento (DE25%). Además, con la DE25% se observaron variaciones en el perfil de TFA (datos no mostrados) detectándose concentraciones elevadas del ácido *trans-10* C18:1, lo que podría ser indicativo de una alteración de las rutas metabólicas del rumen (Gómez-Cortés *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante destacar que el aumento de la presencia del ácido *trans-10* C18:1 encontrado no conllevó en ningún caso una reducción simultánea de los niveles de TVA. A lo largo del ensayo de suplementación se apreció un considerable aumento del contenido total de FA n3 (**Figura 3.3A**). Tras la inclusión de DE18.5%, los niveles de FA n3 aumentaron de forma acusada y, aunque entre las semanas 2 y 4 no se observaron variaciones, los contenidos fueron incrementándose progresivamente hasta alcanzar el 4.2% de FA n3 del total de FA en la semana 10.

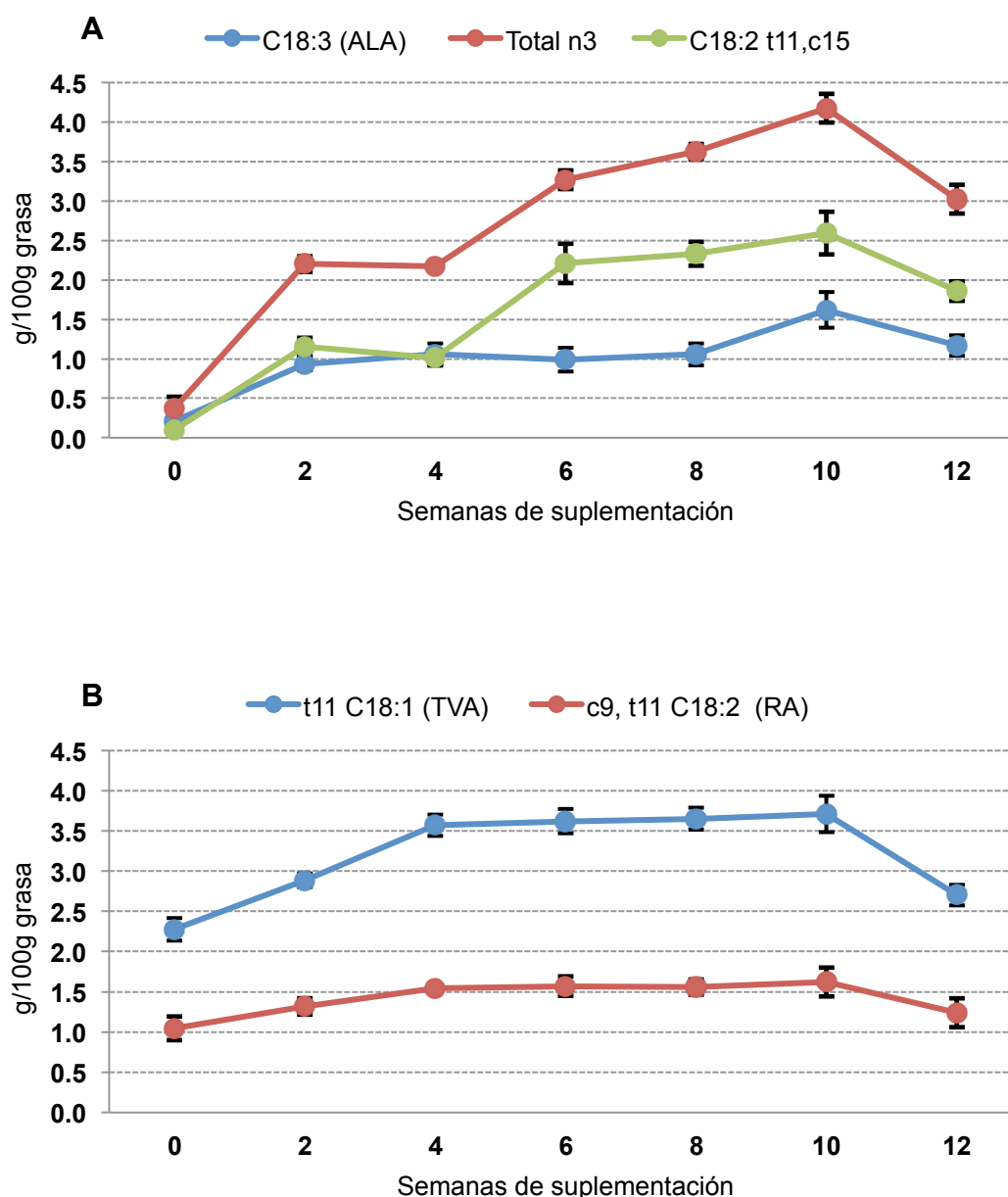


**Figura 3.2.** Evolución temporal del perfil lipídico de la leche de cabra procedente de R1 tras consumir el concentrado con dos dosis diferentes del suplemento Lodym Milk®: 18.5% (DE18.5%) (Semanas 0-6) y 25% (DE25%) (Semanas 6-12).

Tal y como se observa en la **Figura 3.3A**, dicha subida está directamente relacionada con el aumento significativo de la concentración del ácido *trans-11*, *cis-15* C18:2 generado durante la reducción de ALA presente en el suplemento a partir de la hidrogenación de *cis-9*, *trans-11*, *cis-15* C18:3 o ácido rumenelénico (Gómez-Cortés, 2009) (**Figura 3.4**). Los niveles de ALA aumentaron de manera significativa durante las 2 primeras semanas para luego permanecer estables y elevarse hasta un contenido máximo de 1.5% del total de FA en la semana 10, probablemente como consecuencia del cambio de dieta de los rumiantes de DE18.5% a DE25%.

En la **Figura 3B** se muestra la evolución temporal de la concentración de RA y TVA a lo largo del ensayo. Al igual que describieron Bauman *et al.* (2006), resulta evidente la correlación entre los niveles de ambos FA, que siguen una evolución similar en el tiempo.

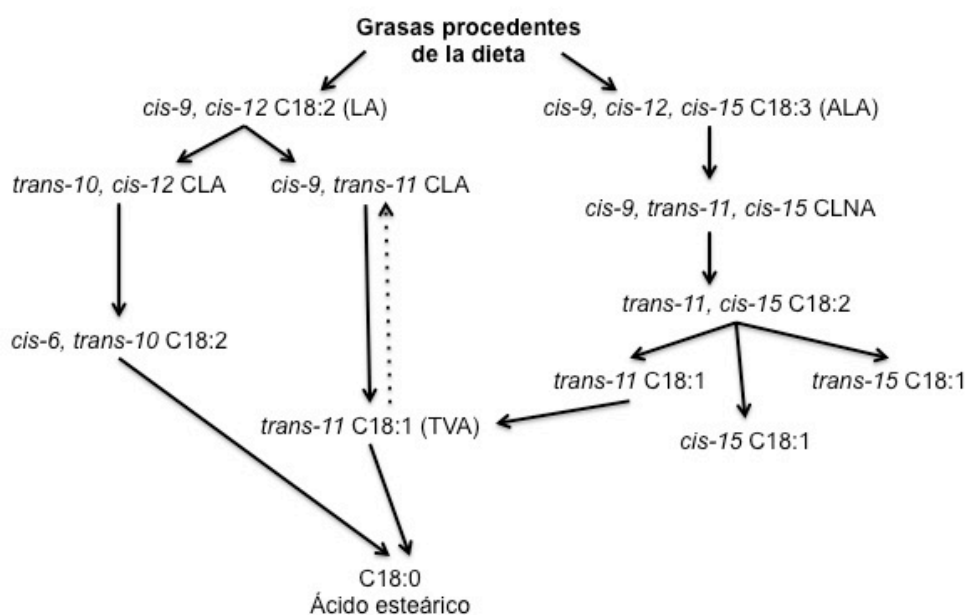




**Figura 3.3.** Evolución temporal en la leche de cabra procedente de R1 sobre la concentración de ALA, el ácido *trans*-11, *cis*-15 C18:2 y los FA omega-3 (**A**), TVA y RA (**B**) tras el ensayo de suplementación: DE18.5% (Semanas 0-6) y DE25% (Semanas 6-12).

Hasta la semana 4 se observó un incremento progresivo de la concentración de RA y TVA, momento a partir del cual se produjo una estabilización (1.5% y 3.6% del total de FA, respectivamente) hasta la semana 10. Por lo tanto, parece que el empleo de una dosis superior de suplemento en el pienso (DE18.5% vs. DE25%) no tiene como consecuencia el aumento de la presencia de ninguno de los FA e incluso su contenido

se ve reducido significativamente en la semana 12. Teniendo en cuenta que los niveles basales de RA presentes en la leche de R1 eran más elevados de lo esperado para la leche de cabra (~1%), el aumento en la concentración de RA como consecuencia del cambio de dieta fue más modesto que el detectado para otros FA.



**Figura 3.4.** Proceso de biohidrogenación de LA y ALA en el rumen y síntesis endógena de CLA en la glándula mamaria (flecha con puntos). Figura adaptada de Bauman *et al.* (1999).

### 3.4. CONCLUSIONES PARCIALES

La estrategia utilizada en este estudio, consistente en el empleo de un pienso el cual integraba el suplemento Lodyn Milk® en su composición, mejoró de manera significativa la composición lipídica de la leche de cabra de acuerdo con los objetivos del proyecto.

La dosis óptima del suplemento a incorporar en el pienso fue DE18.5%, ya que permitió obtener, de manera natural, una leche de cabra enriquecida en compuestos bioactivos como FA n3 y CLA sin producir problemas de ingesta y alteraciones en el rumen de las cabras como las que se observaron con la dosis superior del suplemento DE25%.

# 4. CARACTERIZACIÓN DE UN QUESO DE CABRA ENRIQUECIDO DE MANERA NATURAL EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

Santurino, C., Calvo, M.V., Gómez-Candela, C., & Fontecha, J. (2017).  
Characterization of naturally goat cheese enriched in conjugated linoleic acid and  
omega-3 fatty acids for human clinical trial in overweight and obese subjects.  
PharmaNutrition, 5(1). 8-17.



#### 4.1. INTRODUCCIÓN

La leche de cabra posee una serie de características inherentes que resultan positivas para el organismo, como son su bajo potencial alergénico, su alta digestibilidad y su elevado valor nutricional, lo que la convierte en una alternativa atractiva para el desarrollo de productos lácteos con alto valor añadido como el queso (Medeiros *et al.*, 2014). Dado que la composición lipídica, y en particular los FA de la leche, determinan la calidad nutricional y las características organolépticas de los productos lácteos, el desafío actual de la industria láctea se centra en el desarrollo de estrategias sostenibles que permitan la mejora de la fracción lipídica de los productos lácteos, incrementando la presencia de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos en la salud humana pero sin detrimento de cualidades sensoriales en el producto final.

En el capítulo anterior se demostró la eficacia de la incorporación del suplemento Lodyn Milk<sup>®</sup> a la dieta de las cabras (DE18.5%) como herramienta para mejorar, de forma natural, el perfil lipídico de la leche al disminuir el contenido total de SFA y originar un aumento significativo de la concentración de compuestos bioactivos como ALA y RA, en concordancia con estudios realizados anteriormente en la leche de cabra y de oveja (Haenlein *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2008; Gómez-Cortés *et al.*, 2011).

En Europa existe un creciente interés en el desarrollo de productos con un potencial beneficio para la salud humana a largo plazo, y cuyo consumo sirva para atenuar la incidencia de ciertos problemas relacionados con la salud pública. En particular, las autoridades consideran prioritaria la reducción de la presencia tanto de grasa saturada como de sal en los alimentos por ser ambos considerados un factor de CVR (Reglamento (CE) nº 1924/2006).

Dentro de este marco, se decidió elaborar a escala industrial un queso tierno, de pasta prensada y con reducido contenido en sodio, a partir de la leche de cabra enriquecida naturalmente en FA n3 y CLA procedente del rebaño caprino seleccionado (R1). El objetivo último de este trabajo era la realización de un ensayo clínico en sujetos con sobrepeso y obesidad para evaluar el efecto que el consumo de dicho queso nutricionalmente mejorado pudiera ejercer sobre los marcadores de CVR. El desarrollo de dicho ensayo clínico exigía, además, disponer de una gran cantidad de queso enriquecido que a lo largo del tiempo mantuviera intactos tanto los niveles de todos sus lípidos bioactivos como sus características sensoriales, las cuales pueden verse afectadas por la suplementación de la dieta y por el proceso tecnológico de la elaboración del queso (Chilliard *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2005).

En este contexto, se llevó a cabo la caracterización físico-química y lipídica del queso enriquecido elaborado, haciendo especial hincapié en el análisis de los cambios ocurridos en las fracciones de lípidos neutros y polares. Además, se realizó un análisis de textura y una evaluación sensorial del mismo, y se comprobó el efecto de las condiciones de almacenamiento del producto sobre su composición lipídica.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Elaboración de queso**

La elaboración tanto del queso control (QC) como del queso enriquecido (QE) se llevó a cabo a escala industrial en una quesería de la región de Murcia (España), siguiendo la normativa del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida “Queso de Murcia” (BOE nº 256 de 25 de enero de 2001). Para ello se empleó la leche de cabra pasteurizada, enriquecida en FA n3 y CLA, procedente de la explotación ganadera R1 durante el período en el que consumió la dieta DE18.5%. Se realizaron dos elaboraciones de cada tipo de queso en días consecutivos, empleándose 1200 litros de leche para obtener 180 kg de queso (500 g/pieza) y disponer de muestra suficiente para llevar a cabo el ensayo clínico. Según el Reglamento (CE) nº 1924/2006 de 20 de diciembre de 2006, para obtener un producto con un contenido reducido en sodio, se añadió al QE un 25% menos de sodio que al QC. Posteriormente, y tras un período de maduración de 21 días a 10 °C, todos los quesos se envasaron al vacío con un período de vida útil estimado de seis meses.

### **4.2.2. Almacenamiento en refrigeración/congelación**

Los quesos descritos en el apartado anterior se consideraron el producto de partida para analizar el efecto combinado del envasado al vacío y la temperatura durante un período de almacenamiento de 12 meses. Para ello, cada lote de queso (QC y QE) se dividió aleatoriamente en dos grupos: uno que se conservó en condiciones de refrigeración (4 °C) y otro en congelación (-20 °C).

### **4.2.3. Composición del queso**

El análisis de la composición química de los quesos fue realizado por el Laboratorio de Ensayos de Alimentos (ALIA SAT Nº 2439, Murcia, España).

#### 4.2.4. Extracción lipídica

La extracción de la fracción lipídica de las muestras de la leche y del queso se llevó a cabo según el método descrito por Castro-Gómez *et al.* (2014). Los extractos lipídicos obtenidos se recogieron en viales de vidrio color topacio y, tras ser tratados con una corriente de nitrógeno, se almacenaron a -35 °C hasta el momento de su análisis.

#### 4.2.5. Análisis de los ácidos grasos metil ésteres (FAME) de la fracción lipídica

Los FAME se prepararon mediante metanolisis básica usando hidróxido potásico 2 N en metanol como catalizador (ISO-IDF, 2002). La determinación de los FAME se llevó a cabo en una columna CPSil- 88 (100 m × 0.25 mm d.i. × 0.2 µm) (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EEUU) en un cromatógrafo Agilent (modelo 6890N; Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EEUU) equipado con un detector de espectrometría de masas. La temperatura de la columna se programó según el procedimiento descrito previamente por Castro-Gómez *et al.* (2014): tras la inyección, la columna se mantuvo a 70 °C durante 1 min y luego se programó un aumento de temperatura progresivo de 7 °C/min hasta 170 °C, donde se mantuvo a 170 °C durante 55 min. Después, se programó un aumento de la temperatura 10 °C/min hasta 230 °C, manteniéndose durante 33 min. La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C. El helio fue el gas portador con una presión de entrada de la columna de 206.9 kPa. Las condiciones del detector de masas fueron las siguientes: temperatura de la fuente: 230 °C; temperatura cuadrupolo: 150 °C; energía de ionización por impacto de electrones: 70 eV y se hizo un barrido completo en el rango de  $m/z$  50-500. Para la identificación de los FAME se utilizó la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y tecnología (NIST, Gaithersburg, MD). El volumen de inyección fue de 1 µL y la relación de split utilizada fue 1:25. Los factores de respuesta se calcularon utilizando una grasa anhidra de referencia BCR-164 (Comité Europeo, Bruselas, Bélgica) y se empleó tritridecanoína como patrón interno (200 µL; 1.3 mg/ml). Los análisis fueron llevados a cabo por triplicado y los FAME se expresaron como porcentaje del contenido total de ésteres metílicos.

#### **4.2.6. Análisis de triglicéridos y colesterol**

Los TAG y el CHOL presentes en la leche y el queso se analizaron mediante el método descrito por Fontecha *et al.* (2005) en un GC-FID (modelo Clarus 400, Perkin Elmer Ltd., Beaconsfield, Reino Unido) equipado con un inyector *split/splitless* automático y un detector de llama. Se utilizó una columna Rtx-65TAG (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.1  $\mu$ m) (Restek Corp., Bellefonte, PA, Estados Unidos). El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando el siguiente programa de temperatura: se mantuvo a 120 °C durante 30 seg para posteriormente aumentarla 10 °C/min hasta alcanzar 220 °C y se mantuvo durante 30 seg. Se aumentó de nuevo la temperatura 6 °C/min hasta alcanzar 350 °C y ésta se mantuvo 30 min. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización de llama fueron 355 °C y 370 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador (172 kPa) y el volumen de inyección fue de 0.5  $\mu$ l de una disolución de grasa láctea en hexano a 20 mg/ml. Para la determinación y cuantificación se utilizó un material de referencia BCR-519 (Comité Europeo; Bruselas, Bélgica) de composición en TAG y CHOL conocida, y como patrón interno se empleó una solución de trinoina (100  $\mu$ l, 1 mg/ml). Los análisis fueron llevados a cabo por triplicado.

#### **4.2.7. Análisis de clases lipídicas por HPLC-Detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD)**

La separación de las clases lipídicas se llevó a cabo en un sistema de HPLC (modelo 1260; Agilent Technologies Inc. Palo Alto, CA, Estados Unidos) acoplado a un detector ELSD (modelo SEDEX 85; Sedere SAS, Alfortville Cedex, Francia) utilizando aire comprimido prefiltrado como gas nebulizante a una presión de 350 kPa a 60 °C y fijando la ganancia del detector en 3. Se utilizaron dos columnas en serie (250 x 4.5 mm Zorbax Rx-SIL, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, Estados Unidos) con un diámetro de partículas de 5  $\mu$ m y una precolumna con idéntico relleno. Antes del análisis, se prepararon disoluciones de las muestras en diclorometano (5 mg/ml) y se inyectaron (50  $\mu$ l) una vez la columna se equilibró a 40 °C. Se utilizó el gradiente de disolventes descrito por Castro-Gómez *et al.* (2014). Tanto las muestras como los patrones fueron analizados bajo las mismas condiciones utilizando disolventes recién preparados. Los ensayos se realizaron por triplicado.



#### **4.2.8. Análisis del perfil de textura (TPA)**

Las propiedades texturales de los quesos fueron analizadas usando un texturómetro TA.XT plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) equipado con una sonda cilíndrica AACC de 36 mm (modelo P/36R) y con una célula de carga de 30 kg. El TPA utilizó el método de doble compresión para imitar la masticación, lo que implicó dos ciclos consecutivos de 20% de compresión con un intervalo de 5 seg entre ciclos y con un desplazamiento de cabezal a velocidad constante (2 mm/seg). Se tomaron seis muestras representativas de cada queso (QC y QE) en forma de cilindro (20 mm de altura y 20 mm de diámetro) que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la prueba. Se empleó el programa informático Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) para determinar los siguientes parámetros de textura: Dureza (N), Cohesividad, Adhesividad, Elasticidad (cm), Gomosidad ( $\text{N}/\text{cm}^2$ ) y Masticabilidad ( $\text{N}/\text{cm}$ ). Se realizaron 2 series de determinaciones con 3 muestras cada una.

#### **4.2.9. Evaluación sensorial**

Los panelistas fueron reclutados entre el personal del Instituto de Investigación de Ciencias de la Alimentación (CIAL) y entrenados para la realización de la evaluación sensorial de los quesos. Los quesos permanecieron a temperatura ambiente durante 1 hora con el fin de poder realizar cortes homogéneos y obtener las condiciones óptimas para realizar la evaluación sensorial. Se retiró la corteza de los quesos y se cortaron en fragmentos de forma y tamaño idénticos (4 cm x 2 cm x 0.5 cm).

Se realizaron dos pruebas diferentes: un test discriminativo triangular de elección forzada y una prueba descriptiva. En la primera prueba se pidió a los panelistas que eligieran la muestra de queso diferente entre tres posibilidades, describiendo además la intensidad de la diferencia en una escala de 0 a 5 puntos. En la prueba descriptiva, los atributos sensoriales analizados fueron color, aroma, carácter graso, sabor salado, textura (dureza) y aceptabilidad general (Norma UNE 87010:1993). Las muestras fueron identificadas con códigos aleatorios de 3 dígitos y todos los atributos fueron clasificados en una escala de 10 puntos. La evaluación sensorial se llevó a cabo en tres días diferentes con 18 panelistas.

#### 4.2.10. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medianas  $\pm$  SD. El análisis estadístico de la diferencia se llevó a cabo mediante una prueba no paramétrica (U-Mann Whitney). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS (SPSS 20.00 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL). El criterio de significación fue  $p < 0.05$  para todas las comparaciones.

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1. Caracterización del queso

##### 4.3.1.1. Composición físico-química y nutricional

En cuanto a la composición química de los quesos, ambos mostraron un valor energético similar, siendo la principal diferencia entre ellos el contenido de sodio, el cual fue un 25% inferior en el QE (470 mg/100g) en comparación con el QC (630 mg/100g) (**Tabla 4.1**).

##### 4.3.1.2. Caracterización lipídica

En términos generales, la composición en FA de las leches (LC y LE) no se vio afectada por el tratamiento térmico y, por tanto, las diferencias entre la leche cruda y la pasteurizada respecto al contenido de los FA de interés fueron insignificantes. Por esta razón, sólo se muestran los datos correspondientes a las leches pasteurizadas empleadas para fabricar los quesos.

Tal y como se observa en la **Tabla 4.2**, los perfiles lipídicos de los quesos elaborados en este estudio (QC y QE) no diferían sustancialmente de los observados en las leches empleadas en su elaboración (LC y LE), sugiriendo que la composición de FA no experimentó cambios importantes como consecuencia del proceso de transformación de la leche en queso.

Se produjo una disminución significativa del contenido de SFA en el QE desde un 67% a un 56% del total de FA. La concentración de ciertos SCFA (C4:0, C6:0 y C8:0) apenas se vio afectada por la suplementación, probablemente debido al hecho de que dichos FA son parcialmente sintetizados a través de vías metabólicas que no dependen de la enzima acetil-coA carboxilasa. Sin embargo, el contenido de los FA relacionados con el aumento de los niveles CHOL en sangre (C12:0, C14:0 y C16:0), así como el del ácido cáprico (C10:0), disminuyó de manera significativa en el grupo experimental (21%, 19%, 26% y 14%, respectivamente). Estos resultados fueron

comparables con los encontrados por Gassi *et al.* (2012) tras suplementar la dieta de las cabras con semillas ricas en PUFA, y además fueron consistentes con la menor concentración de dichos FA detectada por otros autores en leche de ovejas cuyas dietas fueron suplementadas con lino extrusionado (Gómez-Cortés., 2009; Mele *et al.*, 2011).

**Tabla 4.1.** Composición físico-química y nutricional del QC y del QE.

Composición (g/100g producto)	QC	QE
DM (%)	56.82	57.04
Proteína (%)	18.6	17.69
Grasa (%)	33.28	33.57
Carbohidratos (%)	<0.5	<0.5
Fósforo (mg/100g)	480	470
Calcio (mg/100g)	410	460
Magnesio (mg/100g)	30	40
Sodio (mg/100g)	630 <sup>a</sup>	470 <sup>b</sup>
Valor energético (Kj/100g)	1587.56	1598.64
Valor energético (Kcal/100g)	379.8	382.45
Vitamina D (µg/100gr)	0<1	0<1

<sup>a,b</sup> Los valores con diferentes superíndices dentro de una misma fila difieren significativamente  $p<0.05$ .

La dieta DE18.5% también disminuyó los niveles de FA de cadena impar (C15:0 y C17:0), y de la mayoría de los FA de cadena ramificada (C15:0 *iso*, C15:0 *anteiso*, C17:0 *anteiso*), aunque en menor medida en el QE. Esta disminución fue probablemente consecuencia del metabolismo microbiano de FA en el rumen, tal y como se ha descrito previamente tanto en ovejas (Gómez-Cortés., 2009) como en cabras alimentadas con dietas suplementadas (Gassi *et al.*, 2012). Aunque estos últimos autores describieron un aumento en el contenido de ácido esteárico (C18:0) en la leche cuando las cabras fueron alimentadas con semillas de lino, en nuestro estudio se observó un ligero descenso no significativo de la concentración de dicho FA. Dicha discrepancia probablemente se halle vinculada al efecto que parecen ejercer tanto la raza como ciertos rasgos genotípicos sobre la actividad de la enzima *delta-9* desaturasa presente en la glándula mamaria (Chilliard *et al.*, 2013).

El contenido total de MUFA se incrementó de manera significativa ( $p<0.05$ ) desde un 26.6% en el QC hasta un 32.4% en el QE. Aunque la cantidad de *cis-9* C18:1 apenas se vio afectada por la suplementación, la presencia de otros isómeros *cis* y de la mayoría de los isómeros TFA (excepto *trans-15* C18:1) aumentó de forma considerable en el QE (**Figura 4.1**). Dentro del grupo de los TFA, originados durante la

biohidrogenación de los PUFA en el rumen, el mayor incremento (desde 2.3% hasta un 4.4%) correspondió al TVA. Dicho resultado está bien documentado y ha sido descrito anteriormente por otros autores en dietas de cabras suplementadas con PUFA (Luna *et al.*, 2008; Gassi *et al.*, 2012; Smiddy *et al.*, 2012). Según Turpeinen *et al.* (2002), el TVA puede ser utilizado por el organismo de los humanos para llevar a cabo la síntesis endógena del CLA. Además, estudios recientes sugieren que el consumo de TVA podría tener beneficios para la salud más allá de los que están relacionados directamente con el CLA (Field *et al.*, 2009). El contenido del FA *trans*-10 C18:1 también aumentó tras la suplementación de la dieta con lino alcanzando valores de 2.79% del total de FA en el QE. Aunque este hecho podría estar relacionado con la aparición de algún tipo de alteración en las bacterias del rumen, cabe señalar que la mayor presencia del FA *trans*-10 C18:1 detectada en este estudio no implicó la reducción simultánea de los niveles de TVA y de RA.

Respecto a los PUFA, su contenido total se vio positivamente afectado por la suplementación, aumentando desde el 6.26% (QC) hasta el 11.52% (QE) del total de FA. Aunque no se produjeron cambios significativos en la concentración de LA, sí que se observaron incrementos importantes de otros isómeros de C18:2. El contenido del FA *trans*-11, *cis*-15 C18:2 registró el mayor incremento desde aproximadamente un 0.10% en el QC hasta alcanzar un valor de 2.10% en el QE, de acuerdo con lo descrito previamente por otros autores (Gómez-Cortés *et al.*, 2009, Mele *et al.*, 2011). Este FA es un intermedio en la ruta de biohidrogenación de ALA y probablemente es acumulado en el rumen para posteriormente ser transferido en parte hasta la leche, lo que justificaría su presencia en el queso.

La suplementación fue, además, un medio claramente eficaz para lograr un aumento del contenido de RA (principal isómero del CLA) en la grasa del queso (de 1.4% a 1.9% del total de FA) (**Figura 4.1**). El RA se sintetiza mediante la isomerización del LA en el rumen, pero también en la glándula mamaria a partir de TVA por la vía de la enzima *delta*-9 desaturasa, por lo que existe una fuerte correlación lineal entre los contenidos de TVA y de RA en la leche (Chilliard *et al.*, 2003; Smiddy *et al.*, 2012). El ratio RA:TVA en el QE (0.46) fue menor que en el QC (0.52), de acuerdo con lo descrito por Chilliard *et al.* (2006) y por Luna *et al.* (2008), quienes también hallaron mayores valores para esta relación en las dietas no suplementadas.

La proporción de ALA en la leche (**Tabla 4.2**) aumentó significativamente con DE18.5%, lo que concuerda con los resultados publicados por otros autores en la leche procedente de cabras alimentadas con dietas que contenían distintas cantidades de semillas de lino y en distintas formas de presentación (Chilliard *et al.*, 2004; Luna *et*

*al.*, 2008; Gassi *et al.*, 2012), aunque el nivel de enriquecimiento de ALA fuera inferior al obtenido en este estudio. Esto podría estar presumiblemente relacionado con una mayor disponibilidad de ALA para la absorción en el tracto digestivo, como resultado de la ruptura física del lino por el proceso de extrusión (Gómez-Cortés *et al.*, 2009).

Como consecuencia, el nivel del ALA en el QE fue 5 veces mayor que en el QC, lo que, unido al leve cambio detectado en el contenido de LA, hizo que se redujera significativamente el valor del ratio n6/n3 en el QE (1.23 vs. 8.5).

En lo relativo a las declaraciones nutricionales y de acuerdo al Reglamento (CE) nº 1924/2006, el QE podría considerarse una fuente de un FA n3, ya que contiene una cantidad significativa de ALA (0.64 g por 100 g de producto). No obstante, el Reglamento anterior fue modificado posteriormente para definir con claridad las condiciones de uso y ayudar a los consumidores a elegir alimentos más sanos. Así, el Reglamento (UE) nº 116/2010 del 9 de febrero de 2010, para garantizar que sólo los alimentos que proporcionan una cantidad significativa de FA n3 en sus cantidades de consumo pudieran estar provistos de estas declaraciones, estableció que sólo se puede alegar que un alimento es una fuente de FA n3 cuando el producto contiene al menos 0.30 g de ALA por 100 g y por 100 kcal, o al menos 40 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g y por 100 kcal". Así, aunque el QE contiene un ~33% de grasa y 0.64 g de ALA por 100 g, no podría considerarse un alimento "fuente de FA n3" por ser un producto de alta densidad calórica, es decir, por proporcionar ~380 kcal por 100 g de producto.

**Tabla 4.2.** Efecto de la dieta (DE18.5%) sobre el perfil lipídico de la leche (LC y LE) y del queso (QC y QE). Datos expresados como g/100g del total de FAME (media  $\pm$  SD) (n=3).

FA (%)	LC	LE	QC	QE
C4:0	2.15 $\pm$ 0.08	2.23 $\pm$ 0.02	2.67 $\pm$ 0.05	2.90 $\pm$ 0.09
C6:0	2.58 $\pm$ 0.14	2.49 $\pm$ 0.11	2.78 $\pm$ 0.12	2.77 $\pm$ 0.03
C8:0	2.88 $\pm$ 0.20	2.71 $\pm$ 0.12	2.94 $\pm$ 0.11	2.77 $\pm$ 0.02
C10:0	9.84 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	8.80 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	9.26 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	7.94 $\pm$ 0.29 <sup>d</sup>
C12:0	3.88 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	3.37 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	3.97 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	3.14 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>
C14:0 <i>iso</i>	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02
C14:0	9.25 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	7.11 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	8.18 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	6.60 $\pm$ 0.23 <sup>d</sup>
C15:0 <i>anteiso</i>	0.17 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.002	0.14 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.03
C15:0 <i>iso</i>	0.21 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.06
<i>cis</i> -9 C14:1	0.15 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01
C15:0	0.61 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.65 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.48 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
C16:0 <i>iso</i>	0.13 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.04
C16:0	26.06 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	19.90 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	25.01 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	18.50 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>
C17:0 <i>anteiso</i>	0.53 $\pm$ 0.07	0.50 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.03
<i>trans</i> -9 C16:1 + C7:0 <i>iso</i>	0.53 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.05
<i>cis</i> -9 C16:1	0.79 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	0.66 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>
C17:0	0.47 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.02
<i>cis</i> -10 C17:1	0.25 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02
C18:0	8.59 $\pm$ 0.41	8.23 $\pm$ 0.15	9.03 $\pm$ 0.06	8.39 $\pm$ 0.17
<i>trans</i> - 4 C18:1	0.09 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02
<i>trans</i> -5 C18:1	0.08 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02
<i>trans</i> 6-8 C18:1	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.64 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -9 C18:1	0.40 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.56 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.56 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -10 C18:1	0.75 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	2.99 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	2.79 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
TVA	1.68 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	3.76 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.25 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	4.43 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -12 C18:1	0.66 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.96 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
<i>cis</i> -9 C18:1	19.02 $\pm$ 0.32	18.65 $\pm$ 0.34	18.52 $\pm$ 0.20	17.96 $\pm$ 0.04
<i>trans</i> -15 C18:1	0.51 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	0.69 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
<i>cis</i> -11 C18:1	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.55 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	0.77 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
<i>cis</i> -12 C18:1	0.31 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.71 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>
<i>cis</i> -13 C18:1	0.09 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.26 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -16 + <i>cis</i> -14 C18:1	0.31 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.54 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	0.56 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>
<i>cis</i> -15 C18:1	0.09 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.58 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12 C18:2	0.21 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.04
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 C18:2	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.38 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	2.10 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
LA	3.43 $\pm$ 0.15	3.67 $\pm$ 0.17	3.22 $\pm$ 0.05	3.38 $\pm$ 0.07
ALA	0.26 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.33 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	1.95 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
C20:0	0.26 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.01
C22:0	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02
AA	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
C24:0	0.07 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.01

<sup>a, b</sup> En la leche, los valores con diferentes superíndices dentro de una misma fila, difieren significativamente  $p < 0.05$ ;<sup>c, d</sup> En el queso, los valores con diferentes superíndices dentro de una misma fila difieren significativamente  $p < 0.05$ .

**Tabla 4.2 (Continuación).** Efecto de la dieta (DE18.5%) sobre el perfil lipídico de la leche (LC y LE) y del queso (QC y QE). Datos expresados como g/100g del total de FAME (media  $\pm$  SD) (n=3).

FA (%)	LC	LE	QC	QE
$\Sigma$ SFA	68.06 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	57.42 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	67.09 $\pm$ 1.08 <sup>c</sup>	56.11 $\pm$ 2.03 <sup>d</sup>
$\Sigma$ MUFA	26.47 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>	31.76 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	26.64 $\pm$ 0.78 <sup>d</sup>	32.36 $\pm$ 1.41 <sup>c</sup>
$\Sigma$ PUFA	5.47 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	10.82 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	6.26 $\pm$ 0.33 <sup>d</sup>	11.52 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
RA	0.88 $\pm$ 0.09	1.75 $\pm$ 0.02	1.41 $\pm$ 0.12	1.86 $\pm$ 0.06
Total CLA	0.91 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.98 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.47 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	2.32 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
Total n6	4.11 $\pm$ 0.20	5.09 $\pm$ 0.14	4.19 $\pm$ 0.04	5.00 $\pm$ 0.11
Total n3	0.43 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	3.71 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	4.05 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
n6/n3	9.53 $\pm$ 1.86 <sup>a</sup>	1.35 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	8.54 $\pm$ 1.68 <sup>c</sup>	1.23 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
$\Sigma$ SCFA	17.70 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	16.50 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	18.00 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>	16.60 $\pm$ 0.51 <sup>d</sup>
$\Sigma$ MCFA	14.50 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	11.60 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>	13.60 $\pm$ 1.16 <sup>c</sup>	11.00 $\pm$ 0.96 <sup>d</sup>
$\Sigma$ LCFA	67.70 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	71.90 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>	68.40 $\pm$ 1.72 <sup>d</sup>	72.40 $\pm$ 1.68 <sup>c</sup>
$\Sigma$ trans C18:1	4.41 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>	9.10 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	4.80 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>	9.60 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>
$\Sigma$ cis C18:1	20.30 $\pm$ 0.37	20.70 $\pm$ 0.15	19.80 $\pm$ 1.07	20.80 $\pm$ 0.42
$\Sigma$ C12+C14+C16	39.20 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	30.40 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	37.20 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	28.20 $\pm$ 1.02 <sup>d</sup>

<sup>a,b</sup> En la leche, los valores con diferentes superíndices dentro de una misma fila, difieren significativamente  $p < 0.05$ .

<sup>c,d</sup> En el queso, los valores con diferentes superíndices dentro de una misma fila difieren significativamente  $p < 0.05$ .

#### 4.3.1.3. Efecto del almacenamiento en refrigeración/congelación

Ambos quesos (QC y QE) se mantuvieron durante 12 meses bajo condiciones de refrigeración (4°C) y de congelación (-20 °C). Dado que el QC mostró una evolución similar al QE en las mismas condiciones experimentales, en la **Tabla 4.3** sólo se muestran los datos correspondientes al QE.

Tal y como puede observarse, la temperatura de almacenamiento tuvo un impacto mínimo sobre el perfil lipídico del mismo, al menos cuando el queso estuvo envasado a vacío, por lo que podría concluirse que la mejora en la composición de FA lograda como resultado de la suplementación de la dieta de las cabras, permanece inalterada con las dos temperaturas de conservación estudiadas.

Estos resultados concuerdan con los publicados en dos estudios previos que demostraban que el almacenamiento en congelación de un queso de cabra Monterrey Jack semicurado durante un período de 6 meses (Park *et al.*, 2006) o de 5 años (Park *et al.*, 2013) originaba cambios insignificantes en su calidad química y sensorial. Andic *et al.* (2011) concluyeron que la congelación podría ser un método adecuado para el almacenamiento del queso Motal. Dichos autores también sugirieron que la

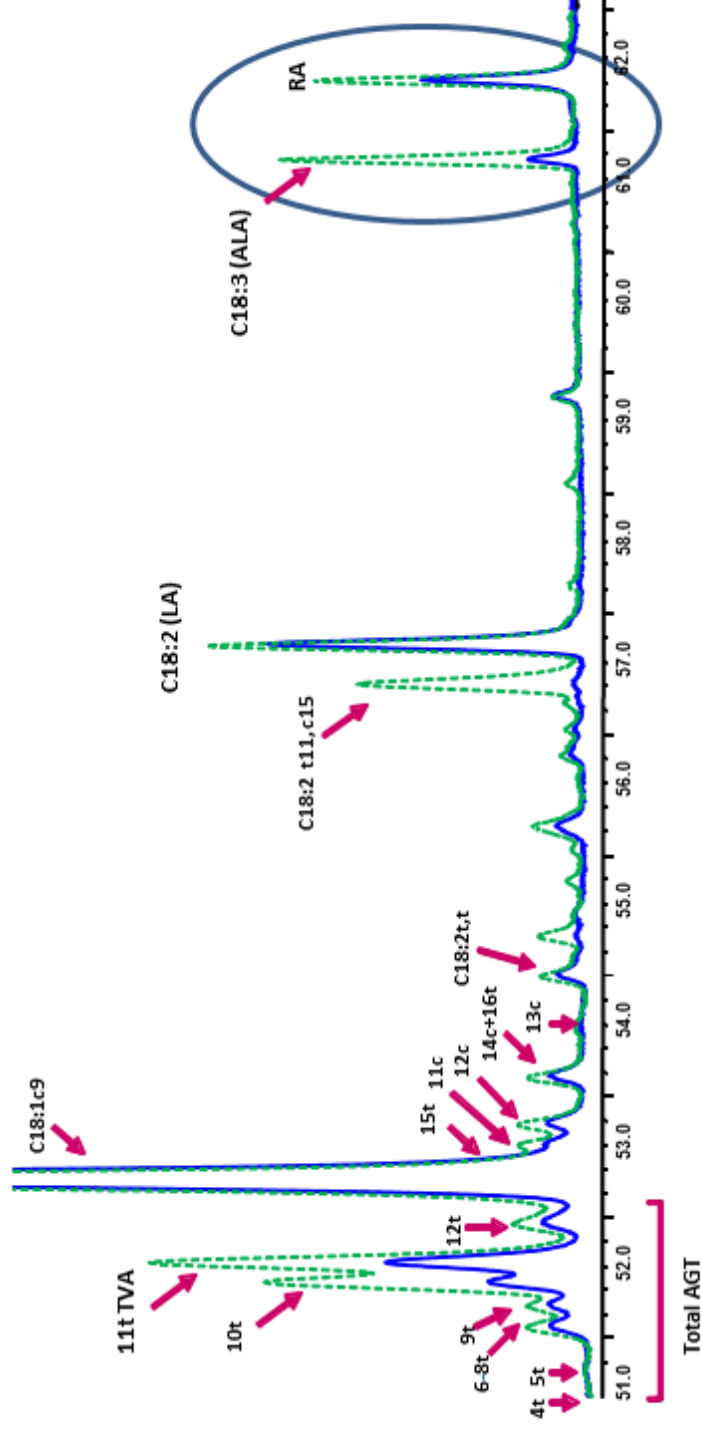
almacenamiento del queso Motal. Dichos autores también sugirieron que la combinación del envasado al vacío y del almacenamiento a temperaturas de refrigeración (4 °C), podrían actuar sinérgicamente para retardar los cambios químicos y sensoriales, conservando así la calidad del queso durante un período mayor de tiempo.

**Tabla 4.3.** Evolución del perfil lipídico del QE tras 12 meses de almacenamiento en condiciones de refrigeración (4 °C) y de congelación (-20 °C). Valores expresados como g/100g del total de FAME (media  $\pm$  SD) (n=3).

FA (%)	Inicio*	Almacenamiento	
		4°C	-20°C
$\Sigma$ SFA	56.50 $\pm$ 1.09	57.30 $\pm$ 0.81	57.82 $\pm$ 0.41
$\Sigma$ MUFA	31.80 $\pm$ 0.90	31.10 $\pm$ 0.42	31.06 $\pm$ 0.79
$\Sigma$ trans C18:1	9.60 $\pm$ 0.13	9.53 $\pm$ 0.10	10.09 $\pm$ 0.09
trans-10 C18:1	2.80 $\pm$ 0.09	2.97 $\pm$ 0.07	3.42 $\pm$ 0.48
TVA	4.43 $\pm$ 0.10	4.25 $\pm$ 0.10	4.52 $\pm$ 0.18
$\Sigma$ cis C18:1	20.90 $\pm$ 1.07	20.39 $\pm$ 0.18	19.87 $\pm$ 0.83
cis-9 C18:1	18.00 $\pm$ 0.04	17.86 $\pm$ 0.20	17.38 $\pm$ 0.34
$\Sigma$ PUFA	11.70 $\pm$ 0.08	11.55 $\pm$ 0.07	11.12 $\pm$ 0.38
LA	3.38 $\pm$ 0.05	3.52 $\pm$ 0.05	3.29 $\pm$ 0.28
ALA	1.95 $\pm$ 0.05	1.90 $\pm$ 0.03	1.95 $\pm$ 0.06
RA	1.86 $\pm$ 0.02	1.98 $\pm$ 0.01	2.04 $\pm$ 0.04
Total CLA	2.32 $\pm$ 0.01	2.38 $\pm$ 0.04	2.28 $\pm$ 0.04
Total n3	4.05 $\pm$ 0.04	4.08 $\pm$ 0.07	4.16 $\pm$ 0.06
Total n6	5.00 $\pm$ 0.28	4.75 $\pm$ 0.41	4.57 $\pm$ 0.31
n6/n3	1.23 $\pm$ 0.08	1.17 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.34
$\Sigma$ SCFA	16.60 $\pm$ 0.21	16.81 $\pm$ 0.32	16.96 $\pm$ 0.69
$\Sigma$ MCFA	11.00 $\pm$ 0.52	11.63 $\pm$ 0.18	11.77 $\pm$ 0.66
$\Sigma$ LCFA	72.40 $\pm$ 0.73	71.56 $\pm$ 0.02	71.26 $\pm$ 0.07

\*Después de un período de maduración inicial de 21 días a 10 °C, los quesos fueron envasados al vacío.





**Figura 4.1.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS de los FAME del extracto lipídico del queso control y del queso enriquecido. ALA ácido  $\alpha$ -linolénico; LA ácido linoleico; TVA ácido vacénico; RA ácido ruménico.

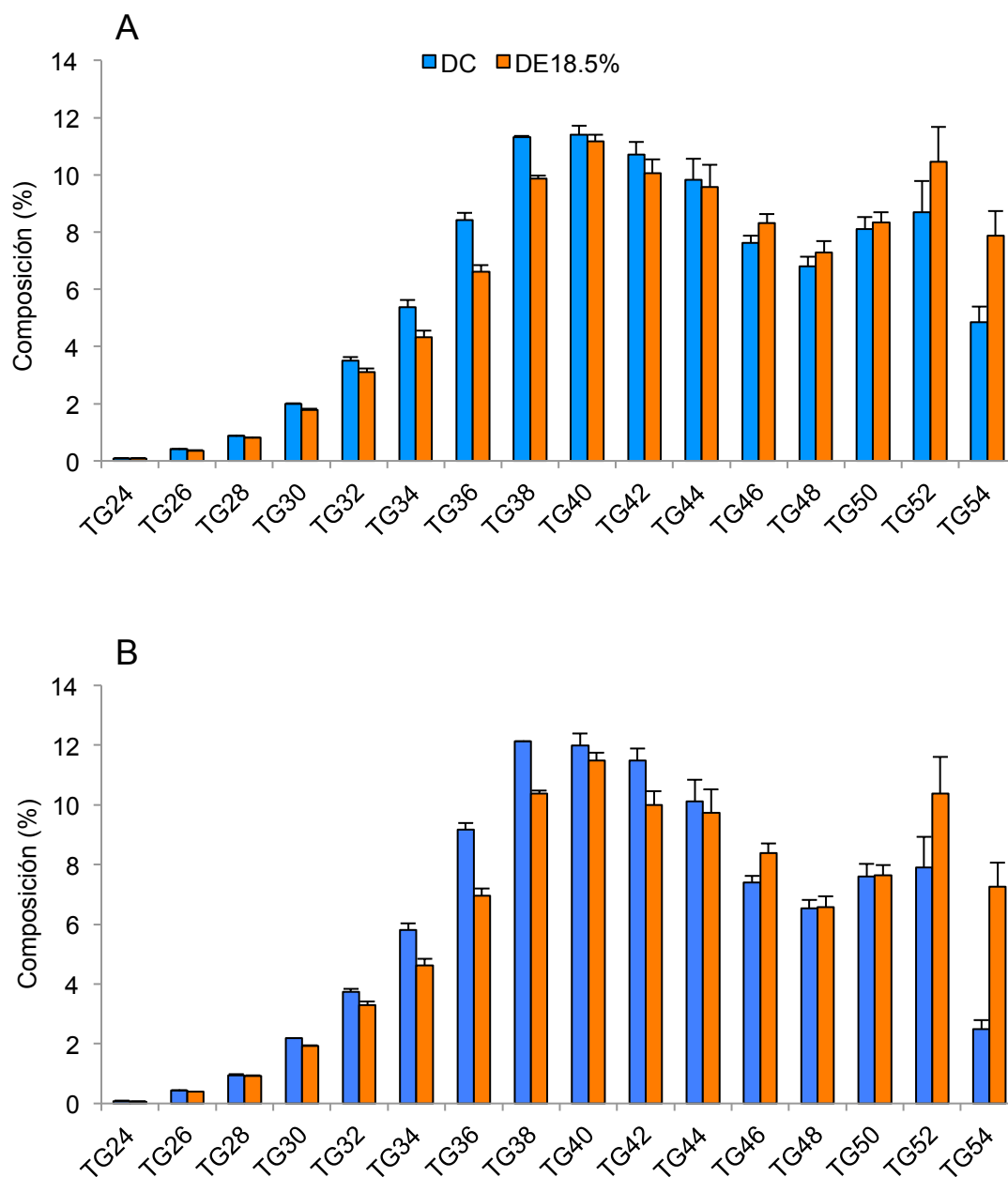
#### 4.3.1.4. Composición en triglicéridos y colesterol

Durante los últimos años ha aumentado el interés por la determinación de la composición de TAG y CHOL en la grasa láctea, debido principalmente a su influencia sobre las propiedades tecnológicas (punto de fusión y comportamiento de cristalización, entre otros), pero sobre todo por su papel en la nutrición y en las CVD (Castro-Gómez *et al.*, 2014; Gómez-Cortés *et al.*, 2015). Aunque existen estudios previos que describen la composición de TAG de la leche de diferentes especies (Fontecha *et al.*, 2000; Goudjil *et al.*, 2003; Gastaldi *et al.*, 2011; Tolentino *et al.*, 2015) así como de algunos tipos de quesos (Vieitez *et al.*, 2013), la información sobre el posible impacto de la suplementación de la dieta de rumiantes en la composición de TAG en leche y productos lácteos es escasa (Mele *et al.*, 2011).

En la **Figura 4.2** se muestra el perfil de TAG de las leches (A) y de los quesos (B) procedentes de las cabras alimentadas con DC y con DE18.5%. El método utilizado para el análisis se basó en la separación de los TAG en función del número total de átomos de carbono (CN) (Fontecha *et al.*, 2005), lo que permitió la cuantificación de 16 grupos de TAG (de 24CN a 54CN) (**Figura 4.3**). Como puede observarse, el proceso de elaboración del queso no alteró sustancialmente el perfil de TAG, ya que no se detectaron diferencias significativas entre la leche y el queso con respecto a su distribución. Sin embargo, al igual que sucedió con la composición de FA (**Tabla 3.2**), la suplementación de la dieta de los rumiantes con lino sí que produjo notables modificaciones en el perfil de TAG tanto en leche como en queso (**Figura 4.2**).

El perfil de TAG en la grasa de la leche de cabra puede presentar dos tipos de distribuciones: unimodal (Fontecha *et al.*, 2000; Tolentino *et al.*, 2015) o bimodal (Gastaldi *et al.*, 2011; Smiddy *et al.*, 2012; Castro-Gómez *et al.*, 2014), con máximos y mínimos localizados en diferentes grupos de TAG. En el presente estudio, tanto la grasa de la leche como la del queso mostraron una distribución bimodal de los TAG, alcanzando el primer máximo entre CN38 y CN40 (~11%) y el segundo máximo entre CN50 y CN52 (~8%). La distribución media de TAG por longitud de cadena (CN26-CN34, CN36-CN44 y CN46-CN54) obtenida para la LC (13.2%, 54.9% y 31.9% respectivamente) fue similar a la publicada por Fontecha *et al.* (1998) en leche de cabra. El perfil de TAG analizado en el QE presentó un contenido menor de TAG de cadena corta (SCTAG) (10.5%) y TAG de cadena media (MCTAG) (47.3%), lo que está presumiblemente relacionado con un menor contenido de FA desde C10:0 a C14:0 (**Tabla 3.2**). Por el contrario, el contenido en TAG de cadena larga (LCTAG) fue

mayor en el QE (42%), debido fundamentalmente al aumento de TAG entre CN52 y CN54, cuyo contenido se dobló con la suplementación.



**Figura 4.2.** Composición en triglicéridos (TG) (%) de la leche (**A**) y del queso (**B**) de cabra en la DC y la DE18.5%. Las barras de error representan valores de SD (n=6).

Estas variaciones en la composición de TAG fueron consistentes con la mayor proporción de PUFA presente en el QE, lo que vendría explicado por la preferencia de la mayoría de los FA mono- y di-insaturados de 18C para ser esterificados en LCTAG (Fontecha *et al.*, 2005). Recientemente, Castro-Gómez *et al.* (2014) señalaron la importancia de los TAG en el mantenimiento de la fluidez de la grasa a temperaturas fisiológicas, y Mele *et al.* (2011) confirmaron también la eficacia de la suplementación con lino en la modificación de la composición de TAG.

Los niveles de CHOL presentes en el QC y en el QE, así como en las leches empleadas en su elaboración, se muestran en la **Tabla 4.5**. El contenido de CHOL en el QC (74 mg/100g de queso o 222mg/100g de grasa) fue inferior al obtenido en estudios previos para leche y queso de oveja (Goudjil *et al.*, 2003). En el QE se encontró una disminución significativa del contenido de CHOL de aproximadamente el 10% en comparación con el QC ( $p<0.05$ ). Dichos resultados fueron similares a los encontrados en quesos elaborados con leche de diferentes especies de rumiantes cuyas dietas habían sido suplementadas con lino (Mele *et al.*, 2011; Rulikowska *et al.*, 2013; Gómez-Cortés *et al.*, 2015) o con aceite de soja (Altenhofer *et al.*, 2014).

**Tabla 4.5.** Efecto de la dieta (DE18.5%) sobre el contenido total de CHOL en la leche y en el queso (n=3). Valores expresados en mg/100g de grasa.

Producto	Leche (mg/100 g grasa)	Queso	
		(mg/100 g grasa)	(mg/100 g queso)
Control	244.1	221.8	73.8
Enriquecido	220.6	201.2*	67.6*

\*Diferencias significativas entre el queso control y el queso enriquecido  $p<0.05$ .

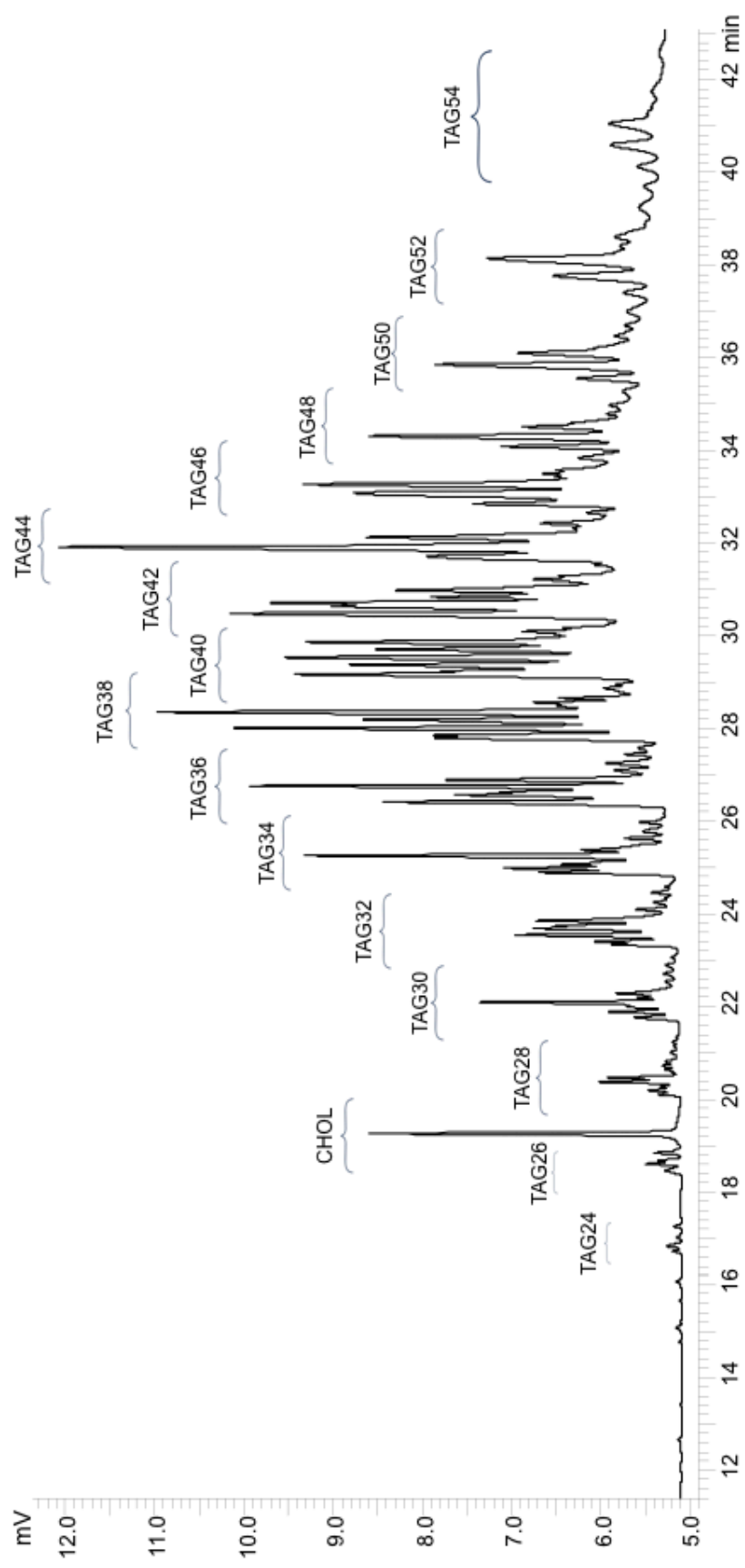
Dado que ni el proceso ni el período de maduración parecen afectar al contenido total de CHOL en el queso (Mele *et al.*, 2011; Martínez-Marín *et al.*, 2012), la suplementación lipídica con lino ha sido propuesta recientemente por Gómez-Cortés *et al.* (2015) como una alternativa útil para reducir el contenido de CHOL en productos lácteos. Si bien la información sobre el impacto del lino en el metabolismo del CHOL en los rumiantes es escasa, se ha sugerido que la mayor cantidad de FA disponible cuando se usan suplementos lipídicos, podría aumentar las necesidades de CHOL para su transporte como QM desde el intestino al torrente sanguíneo, y podría ser, por lo tanto, una razón para la disminución de los niveles de CHOL en el queso (Gómez-Cortés *et al.*, 2015).

#### 4.3.1.5. Composición de clases lipídicas

El efecto de la suplementación de la dieta de las cabras sobre la distribución de clases lipídicas tanto en leche como en queso se muestra en la **Tabla 4.6**. Como era de esperar para productos lácteos, los lípidos neutros constituyeron la fracción mayoritaria (~98%) tanto en el queso como en la leche utilizada para su elaboración, siendo los TAG los principales componentes. Sin embargo, se produjo una reducción del contenido total de TAG en el QE en comparación con el QC (95% frente al 98%), así como en la leche utilizada para su elaboración. Además, se duplicó el contenido de DAG en el QE, lo que sugiere una mayor tasa de lipólisis postordeño en las cabras que consumieron la dieta suplementada (DE18.5%). El aumento del pico de FFA+CHOL encontrado en el QE apoyaría esta hipótesis, ya que la suplementación lipídica redujo el nivel de CHOL en la leche y, por lo tanto, la mayor área de este pico podría atribuirse a una mayor concentración de FFA.

Chilliard *et al.* (2003) confirmaron que el polimorfismo genético en la  $\alpha s1$ -caseína podría ejercer efectos muy importantes sobre algunas características de la leche de cabra, tales como un mayor desarrollo de lipólisis postordeño en aquellos animales que poseen un genotipo *low* CSN1S1. Recientemente, el mismo grupo (Chilliard *et al.*, 2013) encontró una significativa interacción entre los factores anteriormente mencionados y la dieta, de modo que la dieta suplementada con semillas de lino extrusionadas produciría una disminución de la concentración de FFA en la leche tras el ordeño en el genotipo *low* CSN1S1, pero también en el genotipo *high* CSN1S1.

Las discrepancias entre este estudio (Chilliard *et al.*, 2013) y el nuestro podrían estar ligadas a las diferencias genéticas existentes entre las razas caprinas francesas y españolas (Alpina vs. Muriano-Granadina), así como en los aspectos fisiológicos o particularidades de los sistemas de producción. Caravaca *et al.* (2011) y Amills *et al.* (2012) apuntaron, además, que la existencia de factores genéticos y/o ambientales específicos de cada raza podrían dificultar una extrapolación fiable de los resultados obtenidos en las razas de cabra francesas a razas de otros países.



**Figura 4.3.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de los grupos de triglicéridos (TAG) de la fracción lipídica extraída del queso de cabra enriquecido.

Por otra parte, el contenido total de PL fue inferior al 0.1% de la grasa total en todas las muestras analizadas, y no se encontraron diferencias significativas ni entre las dietas ni como resultado del proceso de elaboración del queso. López *et al.* (2008) describieron un incremento del 16% en el contenido de PL en leche de vacas alimentadas con un suplemento a base de lino y, posteriormente, Castro-Gómez *et al.* (2015) obtuvieron un aumento similar al anterior en leche de ovejas alimentadas con una dieta suplementada con aceite de girasol. Según los autores mencionados, dichos resultados podrían estar relacionados con una mayor presencia de glóbulos de grasa, aunque de menor tamaño, en la leche suplementada.

**Tabla 4.6.** Efecto de la suplementación de la dieta sobre la distribución de las diferentes clases lipídicas en la leche y el queso de cabra. Valores expresados como media  $\pm$  DS.

Clase lipídica (%)	Leche		Queso	
	LC	LE	QC	QE
TAG	97.50 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	94.90 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>	98.00 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	95.05 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>
DAG	2.35 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	4.95 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	1.95 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>	4.61 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>
FFA + CHOL	0.04 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
PL	0.07 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01
g /100g of PL				
PE	45.91 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	33.03 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	33.95 $\pm$ 3.16 <sup>c</sup>	25.39 $\pm$ 2.26 <sup>d</sup>
PI	6.06 $\pm$ 0.43	4.53 $\pm$ 0.46	6.37 $\pm$ 0.39	7.43 $\pm$ 2.35
PS	6.90 $\pm$ 0.32	7.66 $\pm$ 0.02	9.93 $\pm$ 0.50	9.26 $\pm$ 2.73
PC	24.99 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	18.25 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	27.83 $\pm$ 1.81	25.01 $\pm$ 3.16
SM	16.15 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	36.53 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	22.56 $\pm$ 1.66 <sup>d</sup>	32.92 $\pm$ 3.32 <sup>c</sup>

<sup>a,b</sup> En la leche, los valores con diferentes superíndices dentro de una misma fila ,difieren significativamente  $p < 0.05$ .

<sup>c,d</sup> En el queso, los valores con diferentes superíndices dentro de una misma fila difieren significativamente  $p < 0.05$ .

En cuanto a los componentes individuales en la fracción de los PL en la leche control, la PE, la PC y la SM fueron los principales compuestos, lo que concuerda con los datos recientemente publicados por Castro-Gómez *et al.* (2014) para la leche de cabra. La dieta suplementada provocó un aumento significativo de la concentración de SM en la leche de cabra (del 16% al 36%) ( $p < 0.05$ ), pero simultáneamente causó una disminución de PE y PC. Previamente, otros autores observaron un aumento en el contenido de SM en leche de vaca cuya dieta fue suplementada con lino (López *et al.*, 2008; Ferreiro *et al.*, 2015), lo cual podría ser interesante dado los posibles efectos beneficiosos de la SM sobre la salud (Rao *et al.*, 2013; Castro-Gómez *et al.*, 2015).

En el queso, aunque el efecto de la suplementación fue también notable, se observaron algunos cambios en la concentración de ciertos PL respecto a lo encontrado en la leche. Dichos cambios estaban probablemente relacionados con el efecto de los procesos tecnológicos (tratamientos térmicos y mecánicos) en la organización de los diferentes lípidos dentro de la matriz del queso (López *et al.*, 2015). Tal y como sugirieron Rombaut *et al.* (2006), durante la elaboración del queso, la MFGM se rompe y se produce una migración preferencial de los fragmentos de la grasa que se concentran específicamente en la cuajada, alterando la relación fosfolípido:lípido en el queso. Así, aunque la cantidad de la SM aumentó un 10% en el QE (de 23% a 33%), el incremento alcanzado fue inferior al observado previamente en la leche. Recientemente, además, Ferreiro *et al.* (2016) describieron una evolución similar del contenido de fosfolípidos durante la producción de queso tipo Quark elaborado a partir de suero de mantequilla.

##### **4.3.1.6. Análisis instrumental de textura y evaluación sensorial del producto final**

Los resultados del análisis del perfil de textura (TPA) (**Tabla 4.7**) mostraron diferencias significativas entre ambos quesos ( $p < 0.05$ ) en el parámetro de dureza, siendo ésta mayor en el QE. Este incremento de la dureza también había sido previamente descrita en quesos Cheddar (Bermúdez-Aguirre *et al.* (2011) y Mozzarella (Caroprese *et al.* (2013), enriquecidos en PUFA mediante el empleo de suplementos a base de lino en la dieta del ganado. Según estos autores, este hecho podría estar relacionado con una disminución del contenido de humedad en los quesos enriquecidos con PUFA. En un estudio reciente, Medeiros *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares en quesos elaborados a partir de leche de cabras alimentadas con una dieta suplementada con aceites vegetales, y establecieron que dicha variación no puede atribuirse inequívocamente a la adición de aceites en la dieta de los rumiantes, sino que podría estar causada por la interacción entre los componentes de la leche (glóbulos de grasa, micelas de caseína, etc.) y a las variaciones del pH, que podrían tener un cierto impacto sobre la dureza del queso.

Por otro lado, se encontraron valores más elevados de masticabilidad en el QE, un parámetro relacionado estrechamente con la dureza del queso. No se encontraron, sin embargo, diferencias significativas en los demás atributos de textura analizados (adhesividad, elasticidad y cohesividad).

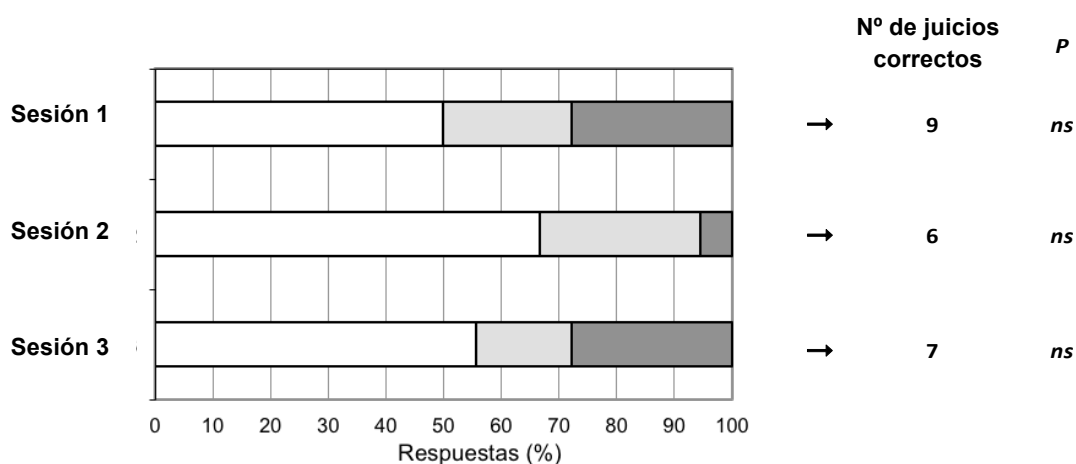


En cuanto a la evolución sensorial (**Figura 4.4**), no se encontraron diferencias significativas entre el QC y el QE en la prueba triangular de elección forzada, considerando que para que una prueba fuera significativa ( $p < 0.05$ ), al menos 10 de los 18 evaluadores debería haber seleccionado la muestra correcta. Referente a los resultados de la prueba descriptiva (**Figura 4.5**), no se observaron diferencias significativas en los parámetros de color, aroma, sabor salado y graso, lo que concuerda con los datos obtenidos en estudios previos en los que se evaluaron quesos de oveja enriquecidos con FA n3 y CLA (Luna *et al.*, 2005; Gómez-Cortés *et al.*, 2009). Sin embargo, sí que se observaron diferencias significativas en cuanto a la dureza durante la masticación ( $p < 0.05$ ) en el QE, confirmando así los resultados obtenidos en el estudio de TPA.

**Tabla 4.7.** Análisis del perfil de textura (TPA) del QC y del QE. Valores expresados como media  $\pm$  DS.

Parámetro	QC	QE
Dureza (N)	12.23 $\pm$ 2.13 <sup>b</sup>	17.32 $\pm$ 2.05 <sup>a</sup>
Viscosidad (g sec)	-0.27 $\pm$ 0.12	-0.178 $\pm$ 0.17
Elasticidad (mm)	9,72 $\pm$ 0.01	9,76 $\pm$ 0.01
Cohesividad	1.01 $\pm$ 0.03	0.999 $\pm$ 0.07
Masticabilidad (N)	11.93 $\pm$ 1.85 <sup>b</sup>	16.88 $\pm$ 2.33 <sup>a</sup>

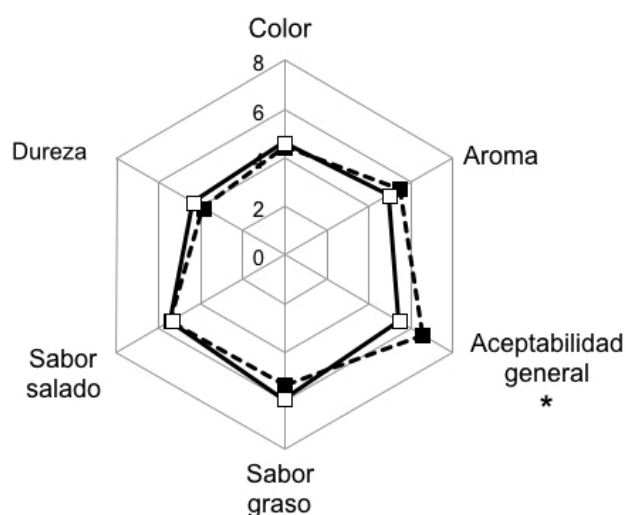
<sup>a,b</sup> Los valores dentro de una misma fila con diferentes superíndices difieren significativamente  $p < 0.05$ .



**Figura 4.4.** Resultados de la prueba triangular de elección forzada. Las barras representan el porcentaje de panelistas que detectaron alguna diferencia entre el QC y el QE. Se utilizó una escala de 5 puntos para evaluar la intensidad de la diferencia: no existe diferencia (□); puntuación para diferencia  $< 3$  (■); y puntuación para diferencia  $> 3$  (■).

Existen trabajos previos que describen resultados análogos en el queso Pecorino (Branciari *et al.*, 2011) y en el queso Mozzarella (Caroprese *et al.*, 2013) enriquecidos en PUFA. Por el contrario, Jones *et al.* (2005) encontraron que los quesos enriquecidos con CLA eran significativamente más suaves y menos firmes que los quesos convencionales.

Por otro lado, y debido a la presencia de ligeras notas de sabor amargo en el QE, su puntuación en el parámetro de aceptabilidad general fue significativamente menor que el QC (**Figura 4.5**). Según la literatura, el enriquecimiento de la leche con PUFA no tiene consecuencias negativas sobre las características organolépticas de diferentes tipos de quesos de oveja (Luna *et al.*, 2005; Gómez-Cortés *et al.*, 2009) y queso de cabra (Gassi *et al.*, 2012). En este sentido, se ha descrito que la reducción del contenido de sodio en el queso, como ocurre en el QE, podría dar lugar a un aumento significativo del nivel de proteólisis, contribuyendo al desarrollo del sabor amargo (Cruz *et al.*, 2011; Guinee *et al.*, 2010; Rulikowska *et al.*, 2013).



**Figura 4.5.** Evaluación sensorial del QC (■) y del QE (□). Los atributos sensoriales se evaluaron empleando una escala de intensidad de 10 puntos.

#### 4.4. CONCLUSIONES PARCIALES

El empleo de la dieta DE18.5% para la alimentación de las cabras permitió la elaboración, a escala industrial, de un queso enriquecido con una fracción lipídica mejorada, ya que se logró una reducción significativa de los SFA, principalmente de

aquellos asociados a la hipercolesterolemia en humanos, y simultáneamente se produjeron incrementos significativos del contenido de compuestos bioactivos como FA n3, CLA y TVA.

La concentración de estos FA potencialmente saludables en el QE se mantuvo estable a lo largo de 12 meses de almacenamiento en las dos temperaturas estudiadas de refrigeración y congelación. Además, aunque la aceptabilidad general del QE fue significativamente menor al QE, no se observaron diferencias significativas entre ambos productos en la prueba triangular de elección forzada. Por lo tanto, la estrategia de alimentación empleada en el estudio podría adoptarse de manera rutinaria en el caso de las cabras lecheras, con el objetivo de lograr un nivel constante de enriquecimiento de la grasa láctea en FA n3 y CLA.

En el QE se observó un incremento de la presencia de LCTAG consistente con la mayor proporción de PUFA presente en su composición. Además, la disminución significativa del contenido de CHOL en el QE, junto con su menor contenido en sal, hacen que éste sea un producto interesante para reducir los factores de CVR.

La dieta suplementada DE18.5% causó un aumento significativo de la concentración de SM tanto en la leche como en el queso, lo cual podría resultar interesante desde el punto de vista de la salud cognitiva en humanos. Sin embargo, deben tenerse en cuenta los posibles efectos de ciertos tratamientos aplicados durante la elaboración del queso, ya que podrían alterar la distribución de algunos PL individuales.

## 5. ENSAYO CLÍNICO EN VOLUNTARIOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD

5.1. ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO Y  
DETERMINACIÓN DE MARCADORES  
SANGUÍNEOS: LIPÍDICOS,  
INFLAMACIÓN Y SACIEDAD

### 5.1.1. INTRODUCCIÓN

Las CVD son la principal causa de muerte a nivel mundial en los países desarrollados. Debido a la notable influencia que ejercen los factores de riesgo relacionados con la alimentación y el estilo de vida, las recomendaciones nutricionales, los hábitos de vida sana y el ejercicio físico regular son la clave para la prevención y su tratamiento. Las recomendaciones nutricionales se orientan principalmente en controlar la cantidad y la calidad de la grasa dietética (30% de las calorías diarias totales y principalmente grasa insaturada), los niveles de CHOL y la reducción de sodio para lograr un buen equilibrio electrolítico (Astrup *et al.*, 2010).

Con el objetivo de establecer consideraciones más individuales en función del tipo y grado de alteración cardiovascular, se han diseñado una gran variedad de alimentos funcionales para disminuir algunos de los factores inductores del CVR, mejorar la salud y reducir el riesgo de enfermedad (Castro, 2007). En este sentido, destacan los productos lácteos por su contribución a la ingesta diaria media de energía (11%), proteína (14%), grasa (17%), calcio (48%), fósforo (24%) y vitamina A (27%), así como la gran facilidad de incorporación de ingredientes a su matriz. Metaanálisis recientes indican que el consumo de productos lácteos ya no se asocia con suficiente evidencia con las CVD, e incluso se sugiere la diferenciación con otros alimentos que contienen SFA por sus diferentes efectos sobre los lípidos sanguíneos y los factores de CVR (Parodi *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013) y el posible efecto cardioprotector de los productos lácteos fermentados (Warensjö *et al.*, 2010).

Aunque en su origen el propósito original de la fabricación de queso fue el mantenimiento de la leche en un producto estable y almacenable, actualmente el queso contribuye al mantenimiento de un buen estado de salud debido a su alto valor nutritivo (Schmid *et al.*, 2015). Por todo ello, es importante estudiar la relación de sus múltiples nutrientes con respecto a la salud cardiovascular (Hjerpsted *et al.*, 2016). Según revisiones recientes de ensayos clínicos en humanos, no existe una evidencia clara de que el consumo de queso en cantidades moderadas esté asociado con un mayor riesgo de sufrir CVD (de Goede *et al.*, 2015; Hjerpsted *et al.*, 2016). En 2010, Elwood *et al.* estudiaron la relación entre el consumo de productos lácteos y el riesgo de sufrir algunas CVD (diabetes, enfermedades cardíacas y accidente cerebrovascular), y concluyeron que no sólo no había suficientes pruebas para asociar el consumo de productos lácteos con un deterioro del estado de salud en humanos, sino que se relacionaban con un posible beneficio.

La suplementación lipídica de la dieta del ganado es la vía más empleada para incrementar los niveles de PUFA n3 como ALA y CLA en los productos lácteos.

Recientemente, el consumo de queso de oveja enriquecido de manera natural con lino demostró tener efectos beneficiosos en marcadores ateroscleróticos, mejorando el perfil lipídico en humanos (Sofi *et al.*, 2010; Pintus *et al.*, 2013). Además, el consumo de algunos FA ha demostrado reducir de manera significativa algunos marcadores importantes de inflamación como la CRP (Skulas-Ray *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesaria una investigación más exhaustiva en este campo para conocer y aclarar los mecanismos responsables de los beneficios debidos al consumo de queso (Hjerpsted & Tholstrup, 2016).

Por todo lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de un queso enriquecido de manera natural en FA n3 y CLA en un ensayo clínico de intervención nutricional en voluntarios con sobrepeso y obesidad, sobre la composición corporal y la determinación de marcadores lipídicos sanguíneos, marcadores de inflamación y marcadores de saciedad.

## **5.1.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.2.1. Descripción del ensayo clínico**

Se realizó un ensayo clínico controlado de intervención nutricional, aleatorizado (1:1), paralelo y doble ciego de 84 días de duración entre marzo a julio del 2014 para evaluar la eficacia del consumo de un queso de cabra enriquecido de manera natural en FA n3 y CLA y bajo en sal (grupo experimental, GE) vs. un queso de cabra control (grupo control, GC) en la modificación del perfil lipídico y la composición corporal de sujetos con sobrepeso u obesidad y perfil lipídico alterado. El ensayo fue registrado en [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov) con el número NCT02630602.

Para el reclutamiento de los sujetos, se realizó una campaña de captación de voluntarios a través de volantes informativos, correos electrónicos y sesiones informativas entre los pacientes de la consulta de la Unidad de Nutrición Clínica y Dietética del Hospital Universitario La Paz (Madrid) durante 4-6 semanas, donde también se llevó a cabo el estudio y seguimiento del ensayo.

Los quesos fueron elaborados, etiquetados y donados por Lodyn S.L. siguiendo sus propios controles de calidad. El enmascaramiento del estudio se consiguió por la presentación y las características idénticas de los productos, siendo sólo identificado con el número de identificación del paciente y el código del producto. Aquellos voluntarios interesados en participar en el estudio que cumplieran con todos los criterios de inclusión y exclusión fueron informados del objetivo del estudio, de las pruebas clínicas y del número de entrevistas y pruebas previstas. Además, los voluntarios

leyeron la Hoja de información al paciente (HIP) y firmaron el Consentimiento informado de participación en la investigación (CI).

#### **5.1.2.2. Consideraciones generales**

Durante su desarrollo, este estudio se ajustó a los principios éticos que tienen su origen en la Declaración de Helsinki y enmiendas, relativas a la investigación médica en humanos (Rid *et al.*, 2009) y a los principios de la Buena Práctica Clínica (BPC) tal y como se establece en las guías ICH-GCP (1996). El ensayo clínico fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz (HULP 4092), el cual fue informado de cualquier enmienda posterior.

#### **5.1.2.3. Selección de la población de estudio y tratamientos**

El cálculo del número de voluntarios fue realizado por la Unidad de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz (Madrid) con nQuery Advisor Release 2.0 (Statistical Solutions, Boston, MA) teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ensayos clínicos previos (Lewis *et al.*, 2011) y a partir de LDL como variable predictora, estimándose una potencia estadística del 80% siendo el tamaño muestral total para el estudio de 60 sujetos con 30 sujetos en cada grupo, aleatorizados en GE y GC:

- GE: los voluntarios consumieron 60 g/día de QE en el contexto de una dieta hipocalórica equilibrada e individualizada y recibieron recomendaciones para la realización de 30 min/día de actividad física aeróbica regular, de intensidad moderada.
- GC: los voluntarios consumieron 60 g/día de QC en el contexto de una dieta hipocalórica equilibrada e individualizada y recibieron recomendaciones para la realización de 30 min/día de actividad física aeróbica regular, de intensidad moderada.

Fueron considerados incluidos dentro del estudio todos los voluntarios que cumplieron todos los siguientes criterios de inclusión:

- ✓ Sujetos de cualquier sexo con edades comprendidas entre 18 y 65 años.
- ✓ Sujetos con IMC  $\geq 27$  y  $< 40$  kg/m<sup>2</sup> (Sobrepeso tipo II, Obesidad tipo I y tipo II).
- ✓ Sujetos con riesgo estimado de CVD  $< 10\%$  a 10 años medido por REGICOR (Registre Glroní del COR) (Marrugat *et al.*, 2003) y cumplir dos de los siguientes factores: ser fumador; varón  $\geq 45$  años o mujer  $\geq 55$  años; historia familiar de CVD



prematura: varones en primer grado <55 años y/o mujeres <65 años; HDL <40 mg/dl en varones y <50 mg/dl en mujeres; LDL  $\geq$ 130 mg/dl y <160 mg/dl; CHOL  $\geq$ 200 mg/dl y TAG  $\geq$ 150 mg/dl y <200 mg/dl (Stone *et al.*, 2005).

- ✓ Sujetos dispuestos a realizar una dieta hipocalórica equilibrada y actividad física regular reglada.
- ✓ Sujetos de los que se obtenga el CI por escrito para participar en el estudio.

Los voluntarios que cumplieron alguno de los siguientes criterios de exclusión no pudieron participar en el estudio.

- ✓ Sujetos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 en tratamiento con insulina.
- ✓ Sujetos con dislipidemia bajo tratamiento farmacológico.
- ✓ Sujetos con HT bajo tratamiento farmacológico.
- ✓ Sujetos con alergia a las proteínas lácteas.
- ✓ Sujetos con insuficiencia hepática o renal.
- ✓ Sujetos bajo tratamiento farmacológico que modifique el perfil lipídico o glucémico (estatinas, fibratos, diuréticos, corticoides, antiinflamatorios, hipoglucemiantes o insulina).
- ✓ Sujetos que hubieran consumido sustancias o fármacos para la pérdida de peso (salvo en aquellos casos que lo suspendieran 30 días antes de comenzar el ensayo).
- ✓ Sujetos que hubieran participado en programas y/o ensayos clínicos de control de peso en los últimos 6 meses.
- ✓ Sujetos con demencia y/o disminución de la función cognitiva.
- ✓ Sujetos con intención de dejar de fumar durante el tiempo de estudio.
- ✓ Embarazadas y en período de lactancia.

Los voluntarios que consumieron alguna medicación o sustancia detallada a continuación durante los 15 días previos al comienzo del ensayo clínico no pudieron seguir participando en dicho estudio: supresores del apetito (anorexígenos), modificadores de la absorción de nutrientes y del consumo energético (termogénicos), fármacos que modifiquen el perfil lipídico (estatinas, fibratos, diuréticos, corticoides), fármacos agonistas de los receptores cannabinoides (dronabinol y babilona) o extractos de cannabis, drogas (*Cannabis sativa*, estimulantes) y/o laxantes.

#### 5.1.2.4. Desarrollo del estudio

En la **Tabla 5.1.1** se describen las visitas del ensayo clínico que conciernen al presente trabajo:

**Tabla 5.1.1** Diagrama de flujo descriptivo de los procedimientos del estudio.

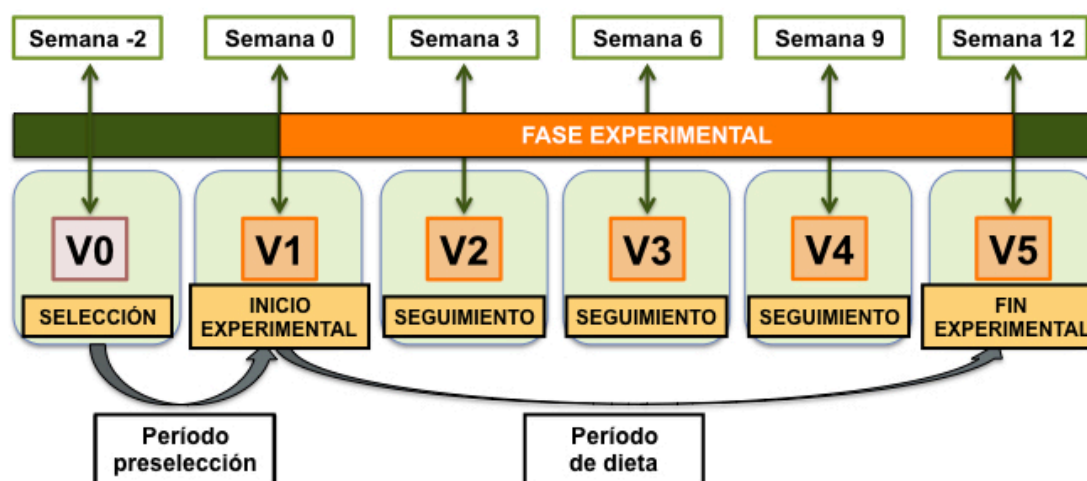
Visita	V0	V1	V2	V3	V4	V5
Semana	S-2	S0	S3	S6	S9	S12
Selección e incorporación al estudio						
Criterios de inclusión/exclusión						
Consentimiento informado						
Historia clínica						
Aleatorización						
Estudio sanitario						
Estudio antropométrico						
Estudio dietético						
Estudio actividad física						
Estudio bioquímico						
Educación nutricional						
Absorciometría dual de rayos X						
Entrega de producto						
Control de consumo						
Adherencia y tolerancia al consumo						
Cumplimiento de tratamiento						
Entrega de material						
Revisión de material						

- **Período de preselección – VISITA 0:** el período de selección tuvo una duración de 2 semanas. Durante este período y después de verificar que los sujetos cumplieran todos los criterios de selección, se les informó de las características y objetivos del ensayo clínico, el calendario de visitas y pruebas previstas, los beneficios esperados y las limitaciones del estudio. Cuando los voluntarios estuvieron de acuerdo con su inclusión en el estudio, se les suministró la HIP y el CI para el ensayo clínico y para el almacén de muestras biológicas en el biobanco, que firmaron antes de la aleatorización.

Los voluntarios fueron examinados, entrevistados y los resultados fueron registrados en la hoja de seguimiento individual de la visita 0 del cuaderno de recogida de datos (CRD). Previamente al inicio del estudio se procedió a: la recogida de los datos de la historia clínica y a la identificación de posibles enfermedades y su

tratamiento, alergias y/o intolerancias alimentarias; examen físico; información sobre las características del ensayo clínico; explicación de las pautas generales para la realización de una dieta siguiendo las pautas de alimentación saludable; entrega del cuestionarios de registro de consumo de alimentos de 3 días previos (Ortega *et al.*, 2003), el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, el cuestionario relacionado con los hábitos de personas con sobrepeso y obesidad y el cuestionario internacional de actividad física (IPAQ) (Ainsworth *et al.*, 2000). Por último, en esta visita se concertó la fecha y hora para la siguiente visita 21 días después (**Figura 5.1.1**).

- **Fase experimental – VISITA 1-5:** el período de seguimiento o de dieta del estudio fue de 3 meses. Se inició en la visita basal o visita 1 (V1) y posteriormente se realizaron tres visitas de seguimiento o visitas control (V2, V3 y V4) y una visita final (V5). Además, según las necesidades particulares del voluntario, se realizaron tantas visitas adicionales como fueron necesarias. Las fechas concertadas para cada una de las visitas fueron, además, recordadas con una semana de antelación a través de una llamada telefónica.



**Figura 5.1.1.** Esquema del diseño del ensayo clínico.

Controles realizados durante las diferentes visitas:

→ **Durante la V1:**

- Datos antropométricos: Composición corporal (TANITA BC-420MA, Biológica Tecnología Médica S.L. Barcelona, Spain), talla (Methodology of nutritional surveillance, 1976, WHO), BMI y circunferencia de cintura (CCi).

- Tensión arterial (TA) (Welch Automatic Monitor, Allyn Spot Vital Signs 420 series) ( $\pm$  5 mm Hg).
- Pauta de dieta hipocalórica e individualizada y actividad física regular (SENC, 2004).
- Asignación aleatoria a uno de los dos grupos de dieta: GC y GE.
- Determinación de los parámetros bioquímicos a través de un análisis sanguíneo a primera hora de la mañana en ayunas (12 horas) por punción venosa obteniéndose los resultados de un hemograma básico y bioquímica general, marcadores del metabolismo de la glucosa (glucosa, insulina), marcadores del metabolismo lipídico (CHOL, HDL, LDL, TAG, ApoA1, ApoB), marcadores de inflamación (CRP, fibrinógeno, TNF- $\alpha$ , IL-6, FFA, LDL-ox), marcadores hormonas (leptina y grelina) y marcadores del metabolismo óseo (calcio, fósforo y vitamina D).
- Estudio de la composición corporal mediante Absorciometría Dual de Rayos X (DXA) empleando GE Lunar Prodigy (GE Healthcare, Madison, WI) para la medición del total de:
  - Densidad mineral ósea (BMD, g/cm<sup>2</sup>): cantidad de materia mineral, generalmente fósforo o calcio por unidad de área en los huesos.
  - Total de masa grasa (TFM, %): tejido formado por adipocitos que realiza funciones importantes de metabolismo hormonal y de reserva.
  - Grasa androide (AN, %): exceso de grasa localizada en la parte superior del cuerpo, particularmente en la zona abdominal.
  - Grasa ginoide (GI, %): exceso de grasa localizada en la parte inferior del cuerpo, particularmente a nivel de glúteos y muslos.
  - Masa magra (LM, %): tejido en el que quedan incluidos todos los componentes funcionales del organismo implicados en los procesos metabólicamente activos (huesos, músculos, agua extracelular, tejido nervioso, etc.).
- Recogida de los cuestionarios de registro de consumo de alimentos de 3 días previos, frecuencia de consumo de alimentos, cuestionario relacionado con los hábitos de personas con sobrepeso y obesidad y el IPAQ.
- Entrega de los cuestionarios de valoración de adherencia y tolerancia al consumo del producto, la escala visual analógica (EVA) para evaluar la motivación-saciedad al comer, el cuestionario para registrar los posibles acontecimientos adversos, el IPAQ, el cuestionario para registrar el consumo de alimentos durante 24 horas y el de análisis de percepción sensorial del producto.
- Entrega del producto asignado (QC o QE).

→ **Durante las visitas de seguimiento o visitas control (V2, V3 y V4):**

- Educación nutricional grupal para reforzar la intervención nutricional, dar pautas para realizar actividad física y controlar el cumplimiento del tratamiento.
- Datos antropométricos: BMI y CCI.
- TA.
- Recogida de los cuestionarios entregados en la V1.
- Entrega del cuestionario de valoración de adherencia y tolerancia al consumo del producto, el cuestionario de acontecimientos adversos, el IPAQ y el registro de consumo de alimentos de 24 horas.
- Entrega en la V4 de los cuestionarios nombrados en el anterior punto y además: EVA, el cuestionario para registrar el consumo de alimentos en 3 días, el registro de frecuencia de consumo de alimentos, el cuestionario relacionado con los hábitos de personas con sobrepeso y obesidad y el análisis de percepción sensorial del producto.
- Entrega del producto asignado (QC o QE).

→ **Durante la V5:**

- Datos antropométricos: BMI y CCI.
- TA.
- Determinación de parámetros bioquímicos a través de un análisis sanguíneo y DXA de la misma manera que en V1.
- Recogida de los diferentes cuestionarios entregados en las diferentes visitas: EVA, el registro de consumo durante 3 días, la frecuencia de consumo de alimentos, el IPAQ, hábitos de personas con sobrepeso y obesidad, valoración de adherencia y tolerancia al producto, el registro de acontecimientos adversos y el análisis de percepción sensorial del producto.

**5.1.2.5. Recogida de muestras sanguíneas**

Las muestras de sangre fueron recogidas al inicio y al final del período experimental y dieta (V1 y V5) posterior a un ayuno nocturno de 12 horas en la Unidad de Extracción del Hospital Universitario La Paz (Madrid). Estas muestras se mantuvieron a temperaturas de refrigeración a 4 °C hasta su análisis en las 24-48 horas siguientes. El análisis bioquímico del perfil lipídico y glucémico se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico enzimático (Olympus AU 5400) (Izasa, CA, EEUU). Las concentraciones de CRP se determinaron a través de un nefelómetro BNII (Siemens

Healthcare Diagnostics GmbH) (Eschborn, Alemania). TNF- $\alpha$  e IL-6 se determinaron utilizando un sistema multianálisis Luminex®-100 con paneles de inmuno-ensayo comercialmente disponibles. Los peróxidos lipídicos totales se determinaron como un indicador del estrés oxidativo utilizando el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y los resultados se analizaron con xPONENT v.3.1 (Millipore). Los análisis anteriores se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de los fabricantes.

#### **5.1.2.6. Procedimientos de cumplimiento y notificación de acontecimientos adversos**

El cumplimiento del tratamiento se determinó al final de cada período experimental utilizando un cuestionario específico, considerándose válido siempre y cuando el voluntario consumiera  $\geq 70\%$  del producto. Todos los sucesos ocurridos durante el estudio clínico fueron registrados en el CRD anotando la fecha de comienzo, de fin y la intensidad (leve, moderada y severa) del acontecimiento. Un efecto adverso se definió como cualquier efecto desfavorable no intencionado, y se registró junto con los posibles síntomas (náuseas, vómitos, diarrea, halitosis, estreñimiento, etc.). Los voluntarios fueron previamente informados del derecho a retirarse del estudio en cualquier momento.

#### **5.1.2.7. Análisis estadístico**

Las variables principales de eficacia del estudio fueron los cambios a lo largo de la intervención en los niveles de CHOL, LDL y HDL. Los cambios en los niveles de TAG, FFA, ApoA1, ApoB, glucosa en ayunas, insulina, HbA1c, HOMA, IMC, CCI, TFM, AN/GI, CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, LDL-ox y fibrinógeno, grelina, leptina, calcio, fósforo y vitamina D fueron consideradas variables secundarias. Cuando la distribución de los resultados fue homogénea (variables paramétricas), el grado de significación de las diferencias de las medias se determinó mediante la prueba *t de Student* para las muestras relacionadas (variables pareadas) y para las muestras independientes (variables no pareadas) o prueba de Chi cuadrado (variables categóricas). Se analizaron de forma exploratoria los porcentajes de los distintos valores de composición corporal, así como los marcadores lipídicos, de inflamación, de saciedad y del metabolismo óseo de los pacientes. Se describieron los valores de estos indicadores mediante mediana y rango en la visita inicial y tras la exposición al QC o al QE. Se compararon los valores de los indicadores evaluados en la primera visita entre

los grupos que recibirían el QC o el QE mediante test de Wilcoxon para determinar las diferencias en los valores analizados en los grupos definidos por aleatorización. También se calcularon las diferencias en los porcentajes de los distintos valores entre la visita inicial y la visita final de tratamiento. Se describieron la mediana y rango de estas diferencias en el grupo de pacientes que recibieron el QC y en el de los que recibieron el QE. Se estimó el intervalo de confianza del 95% de confianza del 95% de la diferencia absoluta de los cambios entre el GE y el GC mediante *bootstrap* acelerado y corregido por sesgo utilizando 1000 repeticiones. Se calculó además la *d de Cohen* parámetro de medida del tamaño de efecto para proporcionar una representación gráfica del cambio e interpretar la magnitud de las diferencias en el cambio. Dado el carácter exploratorio del análisis, no se planificó ninguna corrección para las comparaciones múltiples.

### 5.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1.3.1. Participantes

El diagrama de flujo de los participantes del ensayo clínico se muestra en la **Figura 5.1.2**. Se seleccionaron 80 posibles voluntarios para su inclusión en este estudio (19 hombres y 61 mujeres). Finalmente sólo 68 voluntarios (16 hombres y 52 mujeres) cumplieron los criterios de inclusión y de exclusión. Éstos se aleatorizaron en los dos grupos de intervención. Del total de participantes aleatorizados, 9 no finalizaron el estudio. De los abandonos que tuvieron lugar, un 5.88% (n=5) correspondieron a los voluntarios del GC, mientras que un 7.35% (n=4) pertenecieron a los consumidores del GE. Los abandonos sucedieron por diversas causas: pérdida de seguimiento (n=3), razones personales (n=4), interacciones con medicación (n=1) o por reubicación (n=1). No se detectaron efectos adversos graves que obligaran a la retirada del estudio de algún participante. La diferencia porcentual entre grupos no supuso un desequilibrio significativo para la comparación entre los grupos ( $p=0.150$ ). Por lo tanto, 59 sujetos (14 hombres y 45 mujeres) terminaron el período de intervención de 12 semanas, completaron todas las visitas del estudio y se incluyeron en el análisis estadístico. El GC estuvo integrado por 31 sujetos (23 mujeres y 8 hombres) y el GE por 28 voluntarios (22 mujeres y 6 hombres).

### 5.1.3.2. Características poblacionales, cumplimiento y acontecimientos adversos

La edad media de todos los participantes del estudio fue de 47 años. Al inicio del estudio, las características basales demográficas y los parámetros de composición corporal de los 59 sujetos que completaron el estudio fueron comparables entre los dos grupos y no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos, como se puede ver en la **Tabla 5.1.2**. Por último, fue necesario conocer el cumplimiento del tratamiento en ambos grupos para poder realizar un estudio estadístico válido y comparable entre ambos grupos. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, el cumplimiento fue alto y no existieron diferencias significativas entre los grupos (85% de las dosis de queso consumidas en el GC y 87% en el GE,  $p=0.374$ ), lo que demuestra las buenas características sensoriales y el buen almacenamiento de los productos (Capítulo 4).

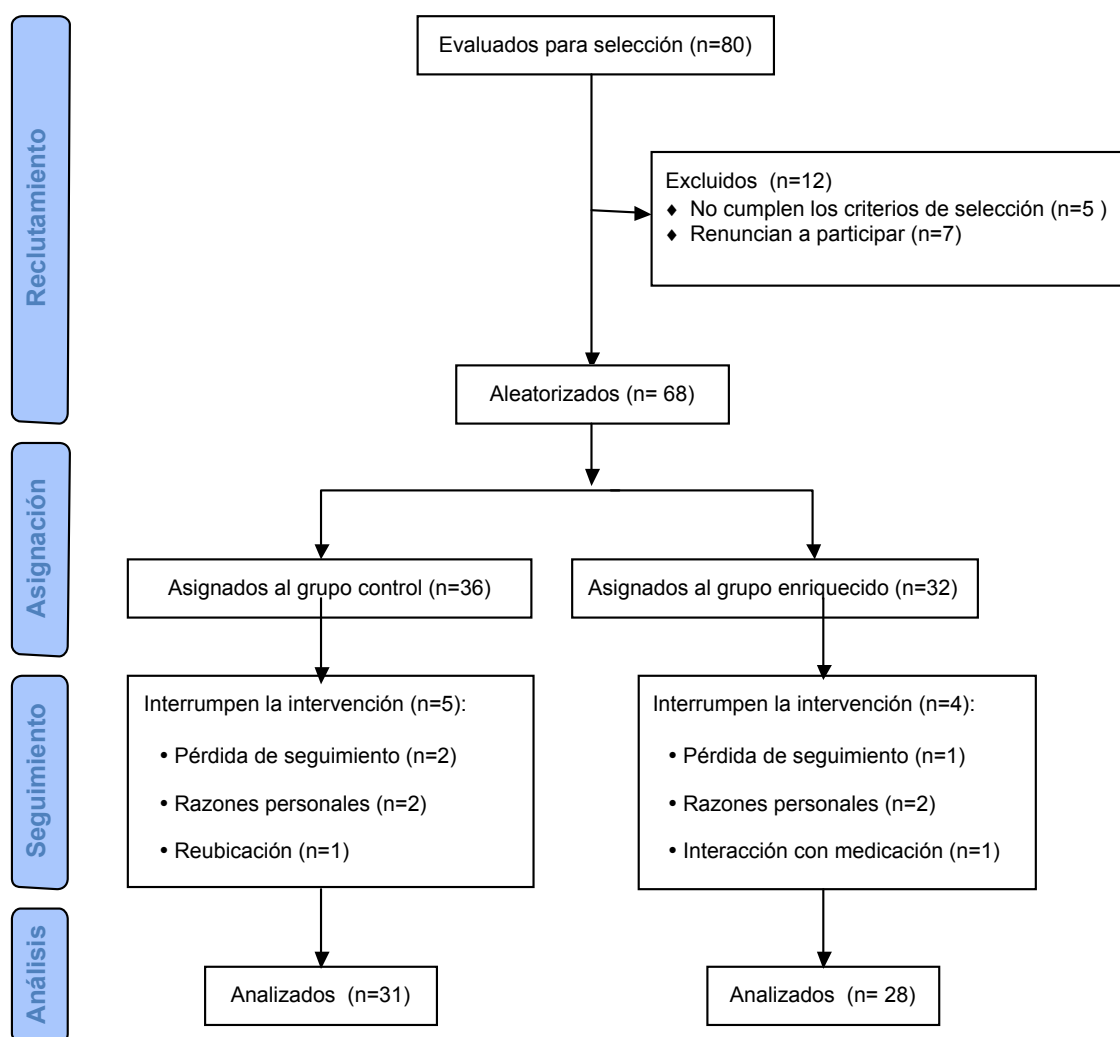
**Tabla 5.1.2.** Acontecimientos adversos a lo largo de la intervención en cada grupo de estudio.

Efecto adverso	GC	GE
Náuseas	1/31 (3.2%)	0/28 (0%)
Pirrosis	5/31 (16.1%)	2/28 (7.1%)
Diarrea	2/31 (6.5%)	1/28 (3.6%)
Estreñimiento	9/31 (29%)	4/28 (14.3%)
Flatulencias	4/31 (12.9%)	2/28 (7.1%)
Mal aliento	3/31 (9.7%)	1/28 (3.6%)
Otros	5/31 (16.1%)	4/28 (14.3%)

Diferencia de frecuencias relativas entre grupos (%)

En la **Tabla 5.1.2** podemos observar que la incidencia de acontecimientos adversos a lo largo de la intervención fue también similar en ambos grupos sin existir diferencias de frecuencias relativas entre grupos. En este sentido, es importante señalar que todos los eventos notificados fueron de naturaleza leve sin requerir ningún tratamiento extraordinario. Debido al bajo número de acontecimientos adversos reportados, no se pudo establecer una relación entre los sucesos y las dos intervenciones diferentes llevadas a cabo durante el ensayo (GC o GE).





**Figura 5.1.2.** Diagrama de flujo de voluntarios participantes en las diferentes fases del ensayo clínico.

### 5.1.3.3. Análisis evolutivo

#### 5.1.3.3.1. Índice de masa corporal (BMI), circunferencia de cintura (CCi) y presión arterial

Antes de empezar el ensayo clínico, el BMI medio de los todos voluntarios fue de  $31.8 \text{ kg/m}^2$ , es decir, Obesidad grado I, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento ( $p=0.846$ ) (**Tabla 5.1.3**). Al finalizar la intervención (V5), ambos grupos disminuyeron tanto su peso corporal como su BMI respecto al inicio del estudio, disminuyendo así el CVR. La falta de diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento ( $p>0.05$ ) coincide con ensayos clínicos de intervención nutricional recientes, en los que el consumo de queso enriquecido de manera natural en PUFA, tanto en voluntarios sanos como en sujetos

con el perfil lipídico alterado, no modificó de manera significativa la composición corporal en comparación con el grupo control, en el contexto de una dieta hipocalórica equilibrada (Intorre *et al.*, 2013; Nestel *et al.*, 2013).

En cuanto al CCi, tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores basales del GC y del GE. Al finalizar el estudio se produjo una reducción de CCi en ambos grupos de intervención (**Tabla 5.1.3**). Aunque la diferencia no fue significativa entre GC y GE ( $p>0.05$ ), los resultados obtenidos podrían estar relacionados con la buena eficacia de la intervención nutricional y las pautas para la realización de actividad física llevada a cabo en ambos grupos de intervención, disminuyendo así el riesgo metabólico especificado por la OMS para los valores de CCi ( $>88$  cm en mujeres y  $>102$  cm en hombres) (OMS, 2016). Estos resultados coinciden con los obtenidos en un ensayo clínico reciente, en el que el consumo de queso no modificó de manera significativa los parámetros antropométricos relacionados con el riesgo metabólico entre los diferentes grupos de estudio (Nilsen *et al.*, 2015).

Por otro lado, la TA se mantuvo dentro de los valores de normalidad para la población general (120/80 mm Hg) y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni al inicio ( $p=0.880$  en la presión sistólica y  $p=0.710$  en la presión diastólica), ni una vez finalizado el estudio clínico ( $p>0.05$ ). La leve disminución no significativa de la frecuencia cardíaca observada al finalizar el estudio tanto en el GC como en el GE podría ser consecuencia de la disminución de peso, mejorando así un factor importante de CVR (Salas-Salvadó *et al.*, 2007) (**Tabla 5.1.3**).

**Tabla 5.1.3.** Características generales, antropométricas y presión sanguínea de los participantes del ensayo clínico. Resultados del inicio (basal V1) y diferencia entre el fin y el inicio del período de tratamiento (incremento V5-V1). Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Característica	Basal V1			Incremento V5-V1		
	GC	GE	P*	GC	GE	P*
Edad (años)	47.60 $\pm$ 9.40	48.50 $\pm$ 7.80	0.684	-	-	-
Hombres (n)	8	6	0.762	-	-	-
Mujeres (%)	25.80	21.40	-	-	-	-
Peso (kg)	85.6 $\pm$ 11.30	86.80 $\pm$ 15.80	0.739	-3.41 $\pm$ 3.13	-3.66 $\pm$ 2.46	0.865
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.05 $\pm$ 3.30	30.74 $\pm$ 4.20	0.846	-1.12 $\pm$ 0.20	-0.93 $\pm$ 0.17	0.756
CCi (cm)	105.00 $\pm$ 10.50	99.55 $\pm$ 10.60	0.953	-5.74 $\pm$ 6.63	-5.87 $\pm$ 3.18	0.889
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.17 $\pm$ 0.12	1.16 $\pm$ 0.13	0.874	-0.004 $\pm$ 0.01	-0.002 $\pm$ 0.14	0.767
Masa magra (%)	45.23 $\pm$ 7.77	46.15 $\pm$ 9.72	0.687	-0.49 $\pm$ 1.24	-0.43 $\pm$ 1.21	0.723
Grasa androide (%)	51.62 $\pm$ 7.19	50.72 $\pm$ 7.14	0.534	-2.80 $\pm$ 2.99	-1.80 $\pm$ 2.44	0.436
Grasa ginoide (%)	47.24 $\pm$ 7.53	47.22 $\pm$ 8.24	0.875	-1.60 $\pm$ 1.99	-2.02 $\pm$ 1.90	0.356
Masa grasa total (%)	46.94 $\pm$ 5.87	46.27 $\pm$ 6.29	0.423	-1.79 $\pm$ 1.80	-1.72 $\pm$ 1.68	0.645
Tensión arterial Sistólica (mm Hg)	110.30 $\pm$ 14.00	110.9 $\pm$ 13.10	0.880	0.45 $\pm$ 9.41	-5.21 $\pm$ 21.35	0.123
Tensión arterial Diastólica (mm Hg)	77.50 $\pm$ 10.70	76.50 $\pm$ 9.50	0.710	-0.61 $\pm$ 7.99	-1.46 $\pm$ 7.79	0.385
Frecuencia cardíaca (ppm)	75.30 $\pm$ 10.50	77.70 $\pm$ 10.50	0.393	-7.23 $\pm$ 9.39	-1.96 $\pm$ 10.97	0.259

\*Diferencias entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p < 0.05$ . BMI Índice de Masa Corporal; CCi Circunferencia de cintura; BMD Densidad Mineral Ósea

#### 5.1.3.3.2. Absorciometría de Rayos X de Energía Dual (DXA)

El análisis realizado con DXA, el cual permite obtener valores más precisos de la variación de la composición de los compartimentos corporales (Bellido & Carreira, 2008), reveló un valor basal de TFM que excedía los valores típicos en personas con sobrepeso (BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) en ambos grupos de intervención (Salas-Salvadó *et al.*, 2007). Sin embargo, al finalizar la intervención, ambos grupos mostraron una disminución tanto de TFM como de la AN y GI. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento asignado debido, muy probablemente, a la dieta hipocalórica recibida en todos los voluntarios (**Tabla 5.1.3**). Es importante destacar que los resultados obtenidos mostraron un mantenimiento tanto de la LM como de la BMD al finalizar el estudio de intervención tanto en el GC como en el GE. Estudios recientes evidencian que la pérdida de peso y/o de masa muscular podría producir una pérdida de la masa ósea (BMD), y subrayan que la importancia de una buena estrategia dietética en el manejo del sobrepeso y de la obesidad debe ir encaminada a la pérdida de peso con el mantenimiento o la menor pérdida posible de masa muscular mediante la realización de ejercicio físico regular (López-Gómez *et al.*, 2016). Consecuentemente, los resultados obtenidos ponen de manifiesto el buen seguimiento de las recomendaciones para la realización diaria de actividad física por parte de todos los voluntarios.

#### 5.1.3.3.3. Hábitos dietéticos, actividad física y riesgo cardiovascular

Los hábitos dietéticos basales demostraron una ingesta similar de macro y micronutrientes por parte de ambos grupos de intervención (**Tabla 5.1.4**). No se observaron diferencias significativas en los hábitos dietéticos basales excepto en el consumo de legumbres ( $p=0.025$ ) y agua ( $p=0.012$ ), mayores en el GE. En cambio, las raciones semanales de carne fueron significativamente más altas en el GC ( $p=0.021$ ). Una vez finalizó el período de intervención, el consumo de agua y de carbohidratos en la dieta de ambos grupos se mantuvo estable dentro de las recomendaciones de las Guías alimentarias para la población española y la nueva pirámide de alimentación saludable (**Figura 5.1.3**) (Aranceta *et al.*, 2016). Aunque el consumo de fruta y verdura no alcanzó la ingesta recomendada al finalizar el estudio (5 raciones/día) (**Figura 5.1.3**), su consumo se vio levemente incrementado tanto en el GC como en el GE. Como se puede observar en la **Tabla 5.1.4**, el consumo de 60 g/día de QC y de QE se

contabilizó como 2 raciones/día de productos lácteos, manteniéndose estable a lo largo de toda la intervención, confirmando una vez más el buen cumplimiento del tratamiento por parte de ambos grupos. Aunque el consumo de carne, pescado y huevos del GC y del GE se mantuvo sin cambios significativos a lo largo del ensayo, encontrándose su consumo dentro de las raciones recomendadas (2-3 raciones/semana de cada uno), se incrementó del consumo de pescado 1 ración/semana en el GE. El consumo de dulces y de bebidas alcohólicas, los grupos de alimentos para los que se recomienda un consumo ocasional o moderado, disminuyó en ambos grupos al finalizar el período de intervención, lo que indica un buen seguimiento de las pautas nutricionales (**Tabla 5.1.4**).

Por último, el GE demostró realizar más minutos semanales de actividad física en el momento de empezar la intervención en comparación con GC ( $p=0.160$ ). Al finalizar el estudio, y debido a las pautas para la realización de, al menos, 30 minutos de actividad física moderada diaria, se produjo un aumento en ambos grupos. Sin embargo, las variaciones entre los dos grupos no fueron significativas debido, muy probablemente, a las grandes diferencias intragrupo (**Tabla 5.1.4**) ( $p>0.05$ ).

**Tabla 5.1.4.** Hábitos dietéticos y actividad física de los voluntarios al principio (V1) y al final (V5) del estudio clínico.

	V1			V5	
Hábitos dietéticos	GC	GE	P*	GC	GE
Pan (r*/d)	1.89 ± 1.00	1.75 ± 0.96	0.588	1.79 ± 1.04	1.94 ± 1.13
Carbohidratos (r/d)	1.55 ± 1.17	1.86 ± 1.28	0.351	1.99 ± 1.27	1.72 ± 1.21
Legumbres (r/d)	1.40* ± 0.77	1.86 ± 0.76	0.025	1.80 ± 1.15	1.50 ± 1.00
Fruta (r/d)	1.59 ± 1.24	1.66 ± 1.19	0.812	2.14 ± 1.15	2.03 ± 1.15
Vegetales frescos (r/d)	0.81 ± 0.56	1.02 ± 1.29	0.438	1.20 ± 1.05	1.13 ± 0.65
Carne (r/sem)	4.97 ± 2.58	3.67 ± 1.51	0.021 *	4.21 ± 2.64	3.39 ± 3.20
Pescado (r/sem)	3.34 ± 2.64	2.56 ± 1.43	0.164	3.17 ± 1.94	3.44 ± 2.13
Productos lácteos (r/d)	2.46 ± 1.19	2.63 ± 1.41	0.625	2.88 ± 1.26	2.67 ± 1.11
Huevos (r/sem)	2.94 ± 1.41	2.26 ± 0.98	0.037	2.22 ± 1.08	2.74 ± 1.27
Aceites (r/d)	3.05 ± 2.17	2.26 ± 1.16	0.084	1.92 ± 1.08	2.56 ± 1.69
Dulces (r/sem)	3.43 ± 2.62	3.30 ± 3.68	0.878	1.90 ± 2.97	2.28 ± 2.47
Beb. alcohólicas (r/sem)	2.04 ± 3.04	1.83 ± 2.17	0.766	1.75 ± 2.66	1.80 ± 3.30
Beb. no alcohólicas (r/sem)	7.23 ± 7.51	4.98 ± 9.24	0.319	3.84 ± 6.41	5.86 ± 6.72
Agua (r/sem)	4.45 ± 1.97	5.94 ± 2.35	0.012 *	6.60 ± 2.61	5.52 ± 2.38
Act. física (MET-min/sem)	606.3 ± 562.2	862.1 ± 782	0.16	756.5 ± 242.4	978.2 ± 348.6

r raciones. \*Diferencias entre los dos grupos de intervención según la prueba de *t* de Student  $p<0.05$ .



**Figura 5.1.3.** Pirámide de la alimentación saludable (SENC, 2015).

#### 5.1.3.3.4. Marcadores sanguíneos lipídicos

En la **Tabla 5.1.5** se observa el contenido de los marcadores sanguíneos del perfil lipídico y en las lipoproteínas plasmáticas al principio y al final del período de intervención en el GC y en el GE. El nivel basal medio de CHOL en el GC fue superior al valor considerado como deseable ( $<200$  mg/dl), mientras que el nivel de CHOL en el GE fue cercano al límite recomendado (**Tabla 5.1.5**). Una vez finalizado el período de intervención, el nivel de CHOL aumentó de manera significativa en el GE en comparación con el GC (**Tabla 5.1.6**). En este sentido, Intorre *et al.* (2013) sugirieron, en un ensayo clínico en el que se estudió el efecto del consumo de un queso enriquecido con PUFA sobre el perfil lipídico en humanos, que el aumento de CHOL

no forma parte de los criterios para diagnosticar el síndrome metabólico. El CHOL proporciona información limitada sobre el CVR y no puede asociarse con un aumento circulante de la concentración de lipoproteínas aterogénicas, ya que el valor de CHOL total incluye la suma de HDL y LDL (Nilsen *et al.*, 2015).

En cuanto al HDL, el GE mostró niveles basales por debajo del valor considerado como deseable (<50 mg/dl) y éste fue significativamente inferior que el del GC ( $p=0.04$ ) (**Tabla 5.1.5**). Sin embargo, una vez finalizada la intervención, se observó un aumento significativo de HDL en la diferencia de los cambios absolutos entre ambos grupos únicamente en el GE (**Tabla 5.1.6**). Este aumento significativo de HDL está en consonancia con otro ensayo clínico, en el que voluntarios hipercolesterolémicos consumieron, durante 10 semanas, un yogur enriquecido en PUFA (Dawczynski *et al.*, 2013). De Goede *et al.* (2016) concluyeron, en una revisión reciente sobre el efecto del consumo de queso sobre los factores de CVR, que la ingesta de queso no sólo no tiene efectos perjudiciales sobre el perfil lipídico en adultos sanos, sino que incluso podría tener efectos beneficiosos sobre ciertos marcadores del perfil lipídico relacionados de manera directa con las propiedades antiaterogénicas del CLA en comparación con el consumo de mantequilla (Goede *et al.*, 2016). Las intervenciones nutricionales que incluyen el consumo de leche y queso enriquecidos en FA n3 y CLA parecen, además, tener efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico sanguíneo (Tricon *et al.*, 2006; García-Alonso *et al.*, 2012). En la misma línea, el efecto del consumo de queso sobre los valores plasmáticos de HDL podría también ser debido a la composición general de la dieta (Murphy *et al.*, 2007), lo que pondría de manifiesto el buen control dietético de este estudio. Aunado a ello, en este estudio se pudo relacionar el incremento significativo de CHOL al aumento significativo de HDL en el GE al finalizar el período de intervención (**Tabla 5.1.6**).

**Tabla 5.1.5.** Perfil lipídico sanguíneo de los voluntarios al principio (V1) y al final (V5) del estudio clínico. Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Compuesto (mg/dl)	GC		GE	
	V1	V5	V1	V5
CHOL	201.80 $\pm$ 40.41	197.16 $\pm$ 36.95	195.39 $\pm$ 37.38	201.46 $\pm$ 38.81
HDL	54.97 $\pm$ 16.47 *	53.97 $\pm$ 11.08	47.89 $\pm$ 8.00 *	52.00 $\pm$ 9.24
LDL	128.97 $\pm$ 31.34	125.61 $\pm$ 29.29	127.32 $\pm$ 32.45	129.71 $\pm$ 31.59
TAG	89.00 $\pm$ 42.24	87.81 $\pm$ 47.65	100.71 $\pm$ 34.33	99.50 $\pm$ 31.59
ApoA1	161.32 $\pm$ 26.62	153.94 $\pm$ 20.85	150.68 $\pm$ 16.30	152.14 $\pm$ 18.40
ApoB	102.42 $\pm$ 21.45	101.65 $\pm$ 22.06	102.86 $\pm$ 23.33	108.00 $\pm$ 26.20
Glucosa	93.06 $\pm$ 8.08	95.39 $\pm$ 8.49	90.82 $\pm$ 9.40	94.54 $\pm$ 7.54

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p<0.05$

**Tabla 5.1.6.** Diferencia en el perfil lipídico sanguíneo entre el final (V5) y el principio (V1) del estudio clínico y sus intervalos de confianza al 95%.

Compuesto (mg/dl)	V5-V1		
	GC	GE	IC95%
CHOL	-2(-90;43)	6.5(-24;50)	10.72 (0.37;22.74) <sup>#</sup>
HDL	2(-48;12)	4.5(-5;16)	5.11 (1.96;11.46) <sup>#</sup>
LDL	3 (-11;16)	2.5 (-9;31)	1.39 (-2.15;5.92)
TAG	6 (-65;75)	1 (-56;53)	-0.02 (-12.79;14.62)
ApoA1	-1 (-28;9.6)	0.3 (-9.8;24)	2.74 (-0.3;6.98)
ApoB	-2*(-19;27)	3.5*(-20;34)	5.92 (0.81;11.77)
Glucosa	2.32 (70.04;94.06)	3.71 (67.05;95.04)	0.05 (-0.1;0.19)

# Variaciones significativas en función del tratamiento definidas por la diferencia absoluta entre los dos grupos.  
IC Intervalo de confianza al 95%

Los valores basales de LDL fueron homogéneos en ambos grupos y éstos se encontraron por debajo de los niveles máximos recomendados, teniendo en cuenta el elevado CVR de los voluntarios del estudio (<160 mg/dl) (**Tabla 5.1.5**). El consumo de queso, tanto en el GC como en el GE, no afectó de manera significativa a los valores de LDL (**Tabla 5.1.6**). Estos resultados coinciden con un estudio reciente en el que se evaluó el efecto del consumo de queso enriquecido en PUFA sobre el perfil lipídico en adultos hipercolesterolémicos (Intorre *et al.*, 2015).

Recientemente, tanto la relación entre el CHOL total y el HDL plasmático, como la que se encuentra entre el LDL y el HDL, se han presentado como buenos indicadores lipídicos de riesgo aterogénico. El índice CHOL/HDL mostró un moderado riesgo aterogénico (>3) en ambos grupos tanto al inicio como al final de la intervención (**Tabla 5.1.7**) (Acevedo *et al.*, 2012), debido muy probablemente al estado basal de sobrepeso, obesidad y perfil lipídico alterado de los voluntarios. Si bien las diferencias entre los dos grupos de intervención no fueron estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ), los resultados mostraron una leve disminución del riesgo aterogénico únicamente en el GE al finalizar el estudio (**Figura 5.1.4**). Aunque sólo se produjo una disminución en la relación LDL/HDL en el GE ( $p>0.05$ ), ambos grupos se mantuvieron por debajo de los valores considerados de riesgo (>3) durante todo el ensayo clínico (Millán *et al.*, 2010).

Los niveles plasmáticos de TAG se mantuvieron dentro de los valores normales de referencia para la población estudiada durante todo el período de tratamiento (<150 mg/dl) (**Tabla 5.1.5**). No se encontraron diferencias significativas en los valores de TAG entre los dos grupos (**Tabla 5.1.6**). En este sentido, De Goede *et al.* (2015) concluyeron, en una revisión y metaanálisis reciente sobre el efecto del

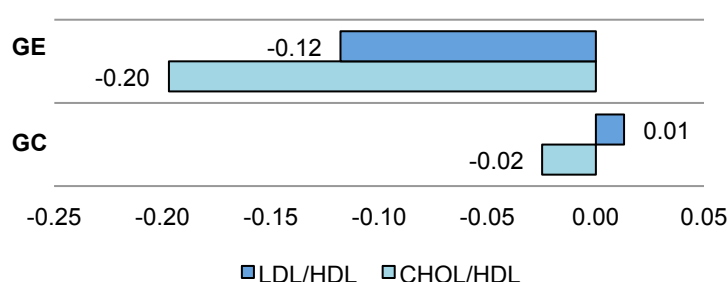


consumo de queso sobre los lípidos sanguíneos, que el consumo de queso no tiene efectos sobre los niveles de TAG en humanos. De este modo, la asociación entre el aumento del consumo de FA n3 y los niveles de TAG podría ser debida a las fluctuaciones constantes de estos niveles en sangre y a las diferencias individuales en la respuesta al consumo de FA n3 (Schuchardt *et al.*, 2014).

**Tabla 5.1.7.** Relación CHOL total/HDL y LDL/HDL de los voluntarios del estudio clínico al principio (V1) y al final del período de intervención (V5). Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Relación	GC		GE	
	V1	V5	V1	V5
CHOL total/HDL	3.67 $\pm$ 2.5	3.67 $\pm$ 3.3	4.06 $\pm$ 4.6	3.87 $\pm$ 4.6
LDL/HDL	1.71 $\pm$ 1.9	1.72 $\pm$ 2.6	1.91 $\pm$ 4.0	1.79 $\pm$ 3.4

\*Diferencias significativas entre los dos grupos de intervención  $p < 0.05$



**Figura 5.1.4.** Diferencia en valores absolutos del riesgo aterogénico del GC y del GE entre el final y el inicio de la intervención.

En la misma línea, Weber y Raederstorff (2000) sugirieron, en una revisión sobre la relación entre el consumo de PUFA y la disminución de TAG, que el consumo de una dosis mínima de 1 g/día de FA n3 es necesario para lograr un efecto en la reducción de TAG, y este efecto podría ser, además, dependiente del tiempo de intervención (Días *et al.*, 2016). Igualmente, es importante recordar que los alimentos funcionales con componentes biológicamente activos, como el QE, pueden aportar beneficios a la salud o poseer efectos fisiológicos deseables pero carecen de propiedades terapéuticas. Por lo tanto, el consumo de FA n3 en el QE durante 12 semanas podría no ser suficiente para reducir los valores plasmáticos de TAG. La ausencia de cambios significativos debidos al consumo del QE sobre los valores de TAG y LDL observados

en el estudio coincide con los resultados obtenidos en diferentes revisiones (Robinson *et al.*, 2006; van Linschoten *et al.*, 2009; de Goede *et al.*, 2015) y con ensayos clínicos en los que se evaluó el efecto del consumo de un producto lácteo sobre el perfil lipídico (Castro *et al.*, 2007; Khandelwal *et al.*, 2009; Dawczynsky *et al.*, 2012 y Kastelein *et al.*, 2014). Además, Kim *et al.* (2016) concluyeron, en una revisión reciente sobre los beneficios potenciales del CLA como ingrediente funcional sobre la salud, que el consumo de algunos productos enriquecidos en CLA, como por ejemplo la leche y el aceite de oliva, no ha demostrado producir cambios efectos significativos en el nivel plasmático de CHOL, TAG y LDL en humanos.

En cuanto a las apolipoproteínas, los niveles plasmáticos de ApoA1 y ApoB se mantuvieron dentro de los valores de referencia para la población estudiada tanto al principio como al final de la intervención (ApoA1 115-220 mg/dl; ApoB 60-138 mg/dl) (Marcovina y Packard, 2006) (**Tabla 5.1.5**). Al finalizar la intervención, se produjo una leve disminución no significativa de ApoA1 en el GC, mientras que los valores de esta apolipoproteína se mantuvieron estables en el GE (**Tabla 5.1.6**). ApoA1 es la apolipoproteína más abundante en el plasma. Ésta es el componente proteico de mayor concentración de HDL y es el responsable de activar la enzima esterificadora de CHOL (Lecitin-colesterol-acetiltransferasa – LCAT) para transportarlo al hígado, metabolizarlo y excretarlo. Por lo tanto, la estabilidad de los niveles ApoA1 contribuye a una buena salud cardiovascular (Sánchez *et al.*, 2008).

Al contrario que ApoA1, la molécula de ApoB está intrínsecamente asociada tanto con las VLDL como con LDL y sus remanentes. Dado que ApoB participa de manera activa en el transporte de CHOL desde el hígado hasta las células vasculares, y que su concentración plasmática total refleja el número total de partículas aterogénicas en la sangre, es considerada un marcador de la concentración de partículas aterogénicas y, por lo tanto, un marcador de CVR (Bays *et al.*, 2011). Al finalizar el período de intervención, la concentración plasmática de ApoB aumentó de manera significativa en el GE (**Tabla 5.1.6**). Estudios previos han reportado pocos cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de ApoB o incluso aumentos cuando se prescriben terapias con FA n3, subrayando la importancia del tiempo de tratamiento para obtener resultados consistentes (Bays *et al.*, 2011; Shaikh *et al.*, 2014). Asimismo, y dado que los niveles plasmáticos de ApoB se consideraron normales para individuos sanos (Stone *et al.*, 2014; Kastelein *et al.*, 2014), la ausencia de cambios en los valores plasmáticos de LDL junto con el aumento significativo de HDL en el GE, el aumento de los niveles de ApoB no puede considerarse un aumento del CVR.

La relación ApoB/ApoA1 refleja el equilibrio entre dos procesos opuestos: el transporte de CHOL a los tejidos periféricos y el transporte reverso hacia el hígado.

Por lo tanto, cuanto menor es el cociente ApoB/ApoA1, más eficaz será el transporte reverso, y en definitiva, menor será el riesgo CVD. Debido a los resultados obtenidos para los valores de ApoA1 y ApoB en ambos grupos de intervención, mostrados en la **Tabla 5.1.6**, el índice ApoB/ApoA1 se vio levemente incrementado al finalizar el ensayo clínico en ambos grupos. Sin embargo, los resultados obtenidos mostrados en la **Tabla 5.1.8** no se encontraron, en ningún momento del período de intervención, por encima de los considerados como valores de riesgo para este índice ( $>1$ ) (Millán *et al.*, 2010).

**Tabla 5.1.8.** Relación ApoB/ApoA1 de los voluntarios del estudio clínico al principio (V1) y al final del período de intervención (V5). Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Relación	GC		GE	
	V1	V5	V1	V5
ApoB/ApoA1	0.63 $\pm$ 0.80	0.66 $\pm$ 1.05	0.68 $\pm$ 1.43	0.71 $\pm$ 1.42

\*Diferencias significativas entre los dos grupos de intervención  $p < 0.05$

Por último, los niveles de glucosa se mantuvieron dentro de los valores de normalidad (70-100 mg/dl) en ambos grupos durante toda la intervención, lo que disminuye el riesgo de padecer hiperglucemia, hiperinsulinemia y diabetes (Samsell *et al.*, 2014). Por lo tanto, la ausencia de cambios significativos en los niveles plasmáticos de glucosa entre el GC y el GE reveló de nuevo las buenas prácticas de intervención nutricional llevadas a cabo a lo largo de todo el estudio clínico.

#### 5.1.3.3.5. Marcadores sanguíneos de inflamación

La obesidad se caracteriza por ser un estado crónico de inflamación de bajo grado. La pérdida de peso está asociada con la reducción de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias responsables de actuar en procesos de inflamación, como TNF- $\alpha$  e IL-6 (Dawczynski *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta la amplia variabilidad de estas citoquinas entre individuos, sus valores se mantuvieron estables a lo largo de todo el período de intervención y dentro de los valores considerados como normales para la población estudiada (IL-6: 0-5 pg/ml; TNF- $\alpha$ : 0-17.3 pg/ml) (Obregón *et al.*, 2010), sin observarse diferencias significativas entre el GC y el GE. Aunque estudios recientes han mostrado un incremento de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 debido al estado de inflamación relacionado con el sobrepeso y la obesidad (Obregón *et al.*, 2010), el consumo de 60 g/día de queso, dentro del contexto de una dieta hipocalórica

equilibrada, mantuvo estables estos niveles al finalizar el período de intervención. Estos resultados están en consonancia con Dawczynski *et al.* (2013), donde el consumo de yogur enriquecido en PUFA tampoco modificó de manera significativa a los valores de los marcadores de inflamación estudiados en voluntarios con sobrepeso y obesidad.

Por otro lado, la lipoproteína LDL-ox y el fibrinógeno son considerados marcadores robustos para valorar el estrés oxidativo *in vivo*, por lo que sus concentraciones plasmáticas se han relacionado directamente con la presencia de resistencia a la insulina y otros factores de CVR (Ruíz-Fernández *et al.*, 2011). Al finalizar el período de intervención, los valores de LDL-ox y fibrinógeno no mostraron variaciones significativas en función del grupo (GC o GE), debido probablemente a la amplia variabilidad entre los individuos de cada grupo (**Tabla 5.1.9**). Los resultados obtenidos están en consonancia con los obtenidos por Joseph *et al.* (2011) en un ensayo clínico cruzado de 8 semanas de duración, en el que la suplementación de la dieta con aceite enriquecido en CLA no modificó los valores plasmáticos de LDL-ox en sujetos con sobrepeso e hiperlipidemia (Joseph *et al.*, 2011).

Los FFA son los únicos lípidos plasmáticos que circulan por el torrente circulatorio sin estar unidos a una lipoproteína, y su concentración puede encontrarse elevada en ciertas patologías, entre ellas el sobrepeso y la obesidad. Altos niveles de FFA en la circulación pueden reflejar una inducción a la inflamación y a la disfunción celular, aumentando así el CVR (Boden, 2008). De la misma manera que para los anteriores marcadores de inflamación, el consumo regular de QC y QE no modificó de manera significativa los niveles plasmáticos de FFA en ningún grupo respecto al inicio de la intervención (**Tabla 5.1.9**), sin observarse diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 5.1.10**).

Asimismo, la concentración plasmática de CRP, una proteína plasmática circulante producida por el hígado, aumenta sus niveles en respuesta a una inflamación generalizada, como en el caso de personas con sobrepeso y obesidad, por lo que su disminución es considerada deseable (Kastelein *et al.*, 2013). En este estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles basales de esta proteína entre los dos grupos de intervención. Sin embargo, tanto en el GC como en el GE, estos niveles fueron superiores a los valores considerados de alto riesgo (>3 mg/l), tanto en el GC (4.1 mg/l) como en el GE (5.5 mg/l) al inicio del ensayo clínico (**Tabla 5.1.9**).

Al final de la intervención, la concentración plasmática de CRP aumentó un 37% en el GC, mientras que este valor disminuyó de manera significativa en el GE un 36% teniendo en cuenta la variación intragrupo (**Tabla 5.1.10**). La disminución de este marcador de inflamación no coincidió con otros estudios previos en los que el

consumo de productos lácteos enriquecidos en FA n3 no modificó de manera significativa la producción de citoquinas pro-inflamatorias en comparación con un grupo control (Miles *et al.*, 2006; Dawczynski *et al.*, 2013; de Goede *et al.*, 2015).

**Tabla 5.1.9.** Marcadores sanguíneos de inflamación de los voluntarios al principio (V1) y al final (V5) del estudio clínico. Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Marcador	GC		GE	
	V1	V5	V1	V5
CRP (mg/l)	2.67 $\pm$ 4.36	2.98 $\pm$ 7.62	2.95 $\pm$ 6.06	1.02 $\pm$ 6.33
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	3.88 $\pm$ 1.45	4.47 $\pm$ 1.43	4.51 $\pm$ 1.57	4.85 $\pm$ 1.71
IL-6 (pg/ml)	2.60 $\pm$ 2.37	3.70 $\pm$ 2.25	2.70 $\pm$ 1.53	3.65 $\pm$ 1.60
Fibrinógeno (mg/dl)	397 $\pm$ 102.82	413 $\pm$ 97.33	419 $\pm$ 124.14	346 $\pm$ 129.64
LDL-ox (ng/ml)	72.71 $\pm$ 238.10	80.53 $\pm$ 245.14	135.09 $\pm$ 229.32	113.47 $\pm$ 218.01
FFA (mM)	0.28 $\pm$ 0.17	0.25 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.11	0.23 $\pm$ 0.10

Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p < 0.05$

**Tabla 5.1.10.** Diferencia en los marcadores de inflamación entre el final (V5) y el principio (V1) del estudio clínico y sus intervalos de confianza al 95%.

Marcador	V5-V1		IC95%
	GC	GE	
CRP (mg/l)	0.03 (-18.12;32.1)	-0.76 (-12.34;3.38)	10.72 (0.37;22.74) <sup>#</sup>
TNF $\alpha$ (pg/ml)	0.5 (-0.8;18.3)	0.75 (-1.2;2.5)	-0.46 (-246;0.28)
IL-6 (pg/ml)	1.2 (-1.7;3.2)	0.95 (-2;5.2)	-0.12 (-0.82;0.6)
Fibrinógeno (mg/dl)	-13 (-333;425)	-17 (-202;106)	-26.88 (-81.27;22.96)
LDL-ox (ng/ml)	0.01 (-164.21;654.9)	-0.31 (-250.92;90.46)	-13.3 (-87.2;16.94)
FFA (mM)	-0.01 (-0.47;0.21)	-0.06 (-0.41;0.2)	-0.03 (-0.09;0.04)

<sup>#</sup>Variaciones significativas en función del tratamiento definidas por la diferencia absoluta entre los dos grupos. IC intervalo de confianza al 95%

Asimismo, otros autores han atribuido la falta de cambios significativos en los valores plasmáticos de CRP a los niveles basales de los marcadores inflamatorios de los voluntarios, la duración del tratamiento y/o a las características fisiológicas de los sujetos (Murphy *et al.*, 2007; García-Alonso *et al.*, 2012; Kastelein *et al.*, 2014). En la misma línea, Kim *et al.* (2016) sugirieron que la ingesta de CLA no parece producir cambios significativos en la concentración plasmática de CRP. Además, Ibrahim *et al.* (2009) concluyeron que la reducción de los niveles de CRP podría estar directamente relacionada con la pérdida de peso, disminuyendo 0.13 mg/dl de CRP por cada kg de peso perdido. Dado que los FA n3 consumidos en la dieta se incorporan a las

membranas celulares interviniendo en los procesos de inflamación y regulación de los factores de CVR, la reducción significativa de los valores plasmáticos de CRP en sujetos con un estado de inflamación cronicada sólo en el grupo que consumió el QE, podría ser debida al resultado sinérgico producido entre el efecto antiinflamatorio del consumo de los FA n3 y CLA dietéticos y la disminución de peso corporal debido al consumo de una dieta equilibrada junto con la realización de actividad física moderada.

#### **5.1.3.3.6. Marcadores hormonales sanguíneos de saciedad y del metabolismo óseo**

El calcio y el fósforo son dos de los minerales más abundantes en el cuerpo humano que interactúan en numerosos procesos del organismo, existiendo una estrecha correlación en la regulación entre ambos. Los valores de calcio sanguíneos considerados normales para la población estudiada se encuentran entre 8 y 10.5 mg/dl, y entre 2.4 y 4.5 mg/dl para el fósforo. Como se observa en la **Tabla 5.1.11**, el valor de los dos minerales en todos los sujetos se mantuvo dentro de los rangos de normalidad descritos durante todo el período de intervención, sin observarse diferencias significativas entre el GC y el GE al finalizar el ensayo clínico (**Tabla 5.1.12**). Mientras que el calcio que se encuentra en el torrente sanguíneo es fundamental para la realización de funciones como la contracción muscular o la transmisión del impulso nervioso, el fósforo es un mineral importante para el mantenimiento de la célula y la producción de energía, entre otras funciones, por lo que el mantenimiento de su concentración resulta de gran importancia para mantener un buen estado de salud (Aguilera *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, el nivel de calcio en el organismo está regulado principalmente por procesos que se encuentran bajo la influencia de la hormona paratiroidea y la vitamina D. La vitamina D, una hormona involucrada en el sistema endocrino que regula la homeostasis mineral, protege la integridad del esqueleto y modula el crecimiento y la diferenciación celular en una amplia variedad de tejidos (Navarro-Moreno *et al.*, 2011). Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de vitamina D entre ambos grupos al finalizar el período de intervención, los niveles basales de vitamina D tanto en el GC como en el GE se encontraron por debajo de los niveles considerados como normales para la población estudiada (20-40 ng/ml). Si bien estudios recientes han relacionado el sobrepeso y la obesidad con un nivel sanguíneo bajo de vitamina D (Pannu *et al.*, 2016), los niveles plasmáticos se encontraron, al finalizar el ensayo clínico, dentro de

los valores considerados como normales para la población estudiada, debido muy posiblemente a la pérdida de peso como resultado del seguimiento de una dieta equilibrada, a la realización de actividad física, y al consumo de leche y productos lácteos, fuentes conocidas de vitamina D en la dieta (SENC, 2016).

**Tabla 5.1.11.** Marcadores hormonales sanguíneos de saciedad y del metabolismo óseo de los voluntarios al principio (V1) y al final (V5) del estudio clínico. Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Marcador	GC		GE	
	V1	V5	V1	V5
Vitamina D (ng/ml)	14.26 $\pm$ 6.15	21.89 $\pm$ 6.94	13.95 $\pm$ 6.06	22.5 $\pm$ 6.33
Calcio	9.16 $\pm$ 0.38	9.24 $\pm$ 0.30	9.16 $\pm$ 0.32	9.30 $\pm$ 0.35
Fósforo	3.35 $\pm$ 0.39	3.41 $\pm$ 0.52	3.46 $\pm$ 0.59	3.32 $\pm$ 0.47
Grelina (pg/ml)	9.9 $\pm$ 13.75	10 $\pm$ 14.42	8.45 $\pm$ 19.62	8.10 $\pm$ 20.69
Leptina (pg/ml)	14.14 $\pm$ 10.74	11.01 $\pm$ 10.00	14.80 $\pm$ 10.80	11.15 $\pm$ 10.50

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p < 0.05$

**Tabla 5.1.12.** Diferencia en los marcadores de saciedad entre el final (V5) y el principio (V1) del estudio clínico y sus intervalos de confianza al 95%.

Marcador	V5-V1		CI95%
	GC	GE	
Vitamina D (ng/ml)	7 (1;23)	8 (0;17)	0.39 (-2.2;2.26)
Calcio (mg/dl)	0.1 (-0.6;0.7)	0.15 (-0.3;0.9)	0.05 (-0.1;0.19)
Fósforo (mg/dl)	0.1 (-0.8;0.8)	-0.1 (-1.4;0.8)	-0.19 (-0.41;0.02)
Grelina (pg/ml)	0.6 (-35.7;40.3)	0.05 (-41.8;39.2)	-0.37 (-7.72;6.78)
Leptina (pg/ml)	-1.8 (-23.03;13.1)	-2.7 (-9.5;2.5)	-0.12 (-0.82;0.6)

\*Variaciones significativas en función del tratamiento definidas por la diferencia absoluta entre los dos grupos. IC intervalo de confianza al 95%.

Por otro lado, los reguladores hormonales del apetito y la saciedad, como la grelina y la leptina, están también relacionadas con el peso corporal. La leptina promueve la reducción de ingesta energética a través de señalizaciones de saciedad y aumento del gasto energético a nivel cerebral, por lo que las personas con sobrepeso y obesidad podrían tener altos niveles de esta hormona en su concentración plasmática (Días *et al.*, 2016). Aunque no se mostraron cambios significativos en función del tiempo de intervención y el grupo de tratamiento al finalizar el ensayo clínico, el análisis intragrupo reveló una leve disminución de los niveles leptina tanto en el GC como en el GE (**Tabla 5.1.12**). Estos resultados eran de esperar después de la realización de una dieta hipocalórica en ambos grupos de intervención y después de la consecuente

pérdida de peso en ambos grupos, resultados que suelen ser paralelos independientemente a los cambios en el perfil lipídico (Klok *et al.*, 2007).

#### **5.1.4. CONCLUSIONES PARCIALES**

El consumo de 60 g/día de queso de cabra enriquecido de manera natural en FA n3 y CLA, dentro del contexto de una dieta hipocalórica equilibrada y recomendaciones para la realización de actividad física diaria, fue efectivo para la disminución de peso corporal, BMI y CCi en ambos grupos de intervención. Además, los hábitos saludables llevados a cabo por todos los sujetos a lo largo del período de intervención tuvieron como resultado una leve disminución de la frecuencia cardíaca, así como de diversos parámetros de la composición corporal: TFM, AN, GI y el mantenimiento de la BMD, produciendo una disminución del CVR.

La inclusión de FA n3 y CLA en el queso fue una estrategia coadyuvante para mejorar los marcadores sanguíneos lipídicos, relacionados de manera directa con el CVR. El mantenimiento de LDL, TAG, y de las apolipoproteínas ApoA1 y ApoB, dentro de los valores considerados normales para la población estudiada, junto con un aumento significativo de HDL en el grupo que consumió el QE, produjo una disminución del riesgo aterogénico el GE.

En cuanto a los marcadores relacionados con la inflamación, se produjo una disminución significativa de los niveles sanguíneos de CRP en el GE, debido probablemente a la sinergia ocurrida entre el consumo de los FA n3 y CLA del QE y la disminución de peso, los buenos hábitos dietéticos y el aumento de la realización de actividad física moderada. Conjuntamente, se produjo un aumento de los niveles sanguíneos de vitamina D en ambos grupos al finalizar el estudio, manteniéndose estables los marcadores hormonales de saciedad y del metabolismo óseo dentro de los valores descritos como normales para la población estudiada.

Por lo tanto, el consumo de queso con una composición lipídica mejorada no sólo no produjo un aumento del CVR en sujetos con sobrepeso y obesidad, sino que podría tener efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico y los marcadores de inflamación, reduciendo el riesgo aterogénico y mejorando el estado de salud. Consecuentemente, el análisis íntegro de los marcadores relacionados con el CVR será imprescindible para la evaluación de los efectos de la ingesta de compuestos bioactivos en futuros ensayos clínicos.





## 5.2. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EN PLASMA Y ERITROCITOS



### 5.2.1. INTRODUCCIÓN

Dentro del contexto de una dieta nutricionalmente adecuada, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) viene recomendando, desde hace algunos años, limitar el consumo de SFA, de manera que represente menos del 10% de las calorías totales de la ingesta diaria, debido principalmente a su posible relación con elevadas concentraciones sanguíneas de LDL (EFSA, 2010). Incluso se ha llegado a sugerir que, para reducir de manera efectiva el riesgo de padecer CVD, el consumo de SFA debería ser incluso inferior a los límites establecidos en dichas recomendaciones internacionales (Intorre *et al.*, 2013). Por el contrario, metaanálisis y revisiones científicas recientes no han encontrado una asociación clara entre el elevado consumo de SFA y la prevalencia de diferentes enfermedades como la diabetes tipo II y la enfermedad cardíaca en adultos sanos (Mente *et al.*, 2009; Mozaffarian *et al.*, 2010; Siri Tarino *et al.*, 2010; Hooper *et al.*, 2015), destacando la diferencia entre el consumo de productos lácteos y otras fuentes de SFA y su efecto sobre los lípidos sanguíneos y las CVD (Dias *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha recomendado el consumo diario de grasas insaturadas, debido principalmente a los efectos cardioprotectores de los PUFA n3 demostrados en ensayos clínicos en humanos que presentan un elevado CVR (Murphy *et al.*, 2007).

Como se ha visto en los capítulos anteriores, la composición de la grasa láctea está fuertemente influenciada por la dieta de los rumiantes y, a través de ésta, es posible aumentar el contenido de algunos FA con efectos beneficiosos para la salud (Montagnese *et al.*, 2015; Abdullah *et al.*, 2015). Aunque algunos estudios habían relacionado estos beneficios con el CLA que se encuentra presente en la leche y en los productos lácteos (Tricon *et al.*, 2006), la mayoría de ellos no están apoyados por datos suficientemente consistentes en ensayos clínicos en humanos (Sneddon *et al.*, 2008).

Los lípidos sanguíneos pueden ser utilizados como biomarcadores del consumo de grasa dietética, que responden de manera diferente según su ingesta y las variaciones genéticas (Abdullah *et al.*, 2015). Mientras que los niveles de FA plasmáticos son indicadores de la ingesta dietética en un período relativamente corto de tiempo (días), los niveles de FA en los eritrocitos reflejan el consumo de alimentos durante semanas, y son considerados marcadores a largo plazo (Nestel *et al.*, 2013; Howe *et al.*, 2014). Por lo tanto, la distribución del contenido de los diferentes biomarcadores lipídicos en cada una de las fracciones sanguíneas es el resultado de la ingesta de grasa dietética, su absorción y su metabolismo (Intorre *et al.*, 2013). Actualmente, el contenido sanguíneo de PUFA y de PL es considerado un biomarcador importante de la dieta y

representa una de las formas más precisas de evaluar el papel de la ingesta de grasa sobre las CVD y el aumento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los países desarrollados (Murphy *et al.*, 2007; Simopoulos, 2016). Asimismo, Nestel *et al.* (2014) asociaron el contenido sanguíneo de C15:0 y C17:0 como un buen biomarcador del consumo de grasa láctea.

Una vez evaluado en el capítulo anterior el efecto del consumo de queso sobre la composición corporal y los marcadores lipídicos habituales, de inflamación y de saciedad, se llevó a cabo el estudio de la influencia del enriquecimiento natural del producto lácteo sobre los componentes lipídicos tanto del plasma como de los eritrocitos de los voluntarios del ensayo clínico, con el objetivo de determinar los posibles biomarcadores de CVR.

## **5.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.2.1. Reactivos químicos**

Todos los disolventes de calidad HPLC (diclorometano, cloroformo, hexano, metanol, isooctano, isopropanol, N, N-dimetilformamida y 2-propanol) y de ácido sulfúrico (98%) se adquirieron de Avantor Performance Materials Polonia S.A. (marca Labscan, Gliwice, Polonia). El carbonato sódico y la arena de mar se obtuvieron de Panreac Química, S.A. (Barcelona, España). La mantequilla de referencia BCR-519 (Comisión Europea, Bruselas, Bélgica) fue comprada a Fedelco Inc. (Madrid, España). El hidróxido de potasio (85%), el hidrogenosulfato anhidro (97%), el cloruro de sodio (99%) y el bicarbonato de sodio (99.9%) procedían de Panreac (Barcelona, España). El metóxido de sodio, cloruro de acetilo (99%), trifluoruro de boro (14% en metanol) y el colesterol (99%, Ch) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.). Tritridecanoato de glicerilo (99%, TAG - C13), se adquirieron de Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, Minnesota, EE.UU.).

### **5.2.2.2. Muestras sanguíneas y análisis de extractos lipídicos**

Se tomaron muestras de sangre de los voluntarios del ensayo clínico al principio y al final del período de intervención como se detalló previamente en el Capítulo 5. La sangre obtenida se sometió a un proceso de centrifugación en el que se produjo la separación inmediata del plasma y de los eritrocitos. Finalmente, todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Se llevó a cabo la extracción de la grasa del plasma como de los eritrocitos mediante el procedimiento descrito por Löfgren *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. Brevemente, un volumen de 200 µl de plasma se disolvió en 1660 µl de metanol en un tubo de vidrio de 10 ml. Después de 10 min de

agitación en el termo agitador (TR100-G, Optic Ivymen System) (1400 rpm) se añadieron 3320 µl de diclorometano. Las muestras se agitaron 20 min más (1400 rpm) y posteriormente se añadieron 1000 µl de ácido acético 20 mM. Una vez agitada la muestra 10 min más, se centrifugó 5 min a 3200 rpm a 4 °C (Hettich 230R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Alemania). La fase orgánica inferior se transfirió a un nuevo tubo de vidrio y a la fase acuosa se le adicionó de nuevo 1660 µl de diclorometano, y se procedió bajo las condiciones anteriormente descritas. Las fases orgánicas se juntaron, se filtraron con una jeringa de vidrio por 0.45 µm y se evaporaron bajo una corriente de N<sub>2</sub> en un equipo N-EVAP<sup>®</sup> (Organomation Associates, MA, USA). Finalmente, todos los extractos lipídicos obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

En el caso de los eritrocitos, se tomaron 400 µl de muestra y se añadieron 6640 µl de metanol en un tubo de vidrio de 50 ml. Después de una mezcla en el vórtex, las muestras fueron sonicadas con un procesador de ultrasonidos (Dr. Hielscher, Twltow, Alemania) durante 1 min, aplicando ciclos de 15 seg de amplitud del 80% y descansos de 10 seg. Para evitar el calentamiento de las muestras durante la sonicación, se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Posteriormente, las muestras se agitaron en el termo agitador durante 10 min (1400 rpm) y se añadieron 13.28 ml de diclorometano. Tras una nueva agitación en vórtex durante 20 min (1400 rpm), se añadieron 4 ml de ácido acético 20 mM, se agitaron durante 10 min y se centrifugaron durante 5 min a 3200 rpm a 4 °C. La fase orgánica inferior se transfirió a un nuevo tubo de vidrio y 6640 µl de diclorometano fueron añadidos a la fase acuosa y se procedió como anteriormente. Las fases orgánicas se juntaron, se filtraron y se evaporaron bajo una corriente de N<sub>2</sub>. Finalmente, el extracto lipídico obtenido de cada muestra se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. El análisis de grupos de TAG se determinó por GC-FID, mientras que el de las clases lipídicas por HPLC con detector ELSD se llevó a cabo mediante los mismos métodos descritos en el Capítulo 4.

Los FAME de los extractos lipídicos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Castro-Gómez *et al.* (2014) y utilizando 25 µL de TAG-C13 (5 mg/ml) como patrón interno. Brevemente, un volumen de 100 µL de plasma se disolvió en una solución de 2.5 ml de metóxido de sodio (0.5 M). Tras una agitación de 10 min a 1400 rpm a 80 °C en el termo agitador, se procedió al enfriamiento de la muestra en hielo durante 5 min y se añadieron 1.83 ml de N, N-dimetilformamida. Tras una nueva agitación en vórtex, se añadieron 3 ml de ácido sulfúrico (1 M). Después de una nueva agitación de 30 min a 1400 rpm a 60 °C, se enfrió la muestra en hielo y se añadió 1 ml de hexano. La muestra se agitó en el vórtex y se añadieron 7.4 ml de carbonato de sodio 6% p/v en

agua Milli-Q. Finalmente, la muestra se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm a 0°C y se transfirió el hexano a los viales para su posterior análisis. En cuanto a los eritrocitos, se disolvieron 400 µL de muestra en una solución de 2.5 ml de metóxido de sodio (0.5 M). Después de una mezcla suave en el vórtex, las muestras fueron sonicadas con un procesador de ultrasonidos (Dr. Hielscher, Twltow, Alemania) durante 1 min (ciclos de 15 seg y descansos de 10 seg) con una amplitud del 80%. Para evitar el calentamiento de las muestras durante la sonicación, éstas se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Tras esta etapa, el protocolo de derivatización llevado a cabo en las muestras de eritrocitos fue el mismo que el descrito para las muestras de plasma. El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos tanto de plasma como de eritrocitos se determinaron por GC-MS mediante el método descrito en el Capítulo 4.

#### **5.2.2.3. Análisis estadístico**

El análisis de distribución de los datos de una muestral homogénea y no homogénea se llevó a cabo mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Cuando la distribución de los resultados fue homogénea (variables paramétricas), el grado de significación de las diferencias de las medias se determinó mediante la prueba *t de Student* para las muestras relacionadas (variables pareadas) y para las muestras independientes (variables no pareadas) o prueba de Chi cuadrado (variables categóricas).

Se analizaron de forma exploratoria los porcentajes de concentración plasmática y eritrocitaria de distintos indicadores de la composición lipídica de los pacientes. Se describieron los valores de estos indicadores mediante mediana y rango en la visita inicial y tras la exposición a QC o QE. Se compararon los valores de los indicadores evaluados en la primera visita entre los grupos que recibirían QC o QE mediante test de Wilcoxon para determinar las diferencias en los valores lipídicos en los grupos definidos por aleatorización. También se calculó las diferencias en los porcentajes de los distintos indicadores lipídicos entre la visita inicial y la visita final de tratamiento. Se describieron la mediana y rango de estas diferencias en el grupo de pacientes que recibieron QC y en el de los que recibieron QE. Se estimó el intervalo de confianza del 95% de confianza del 95% de la diferencia absoluta de los cambios entre el GE y el GC mediante *bootstrap* acelerado y corregido por sesgo utilizando 1000 repeticiones. Se calculó además la *d de Cohen* como parámetro de medida del tamaño de efecto para proporcionar una representación gráfica del cambio e interpretar la magnitud de

las diferencias en el cambio. Dado el carácter exploratorio del análisis, no se planificó ninguna corrección para las comparaciones múltiples.

### 5.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.2.3.1. Composición en ácidos grasos de plasma y eritrocitos

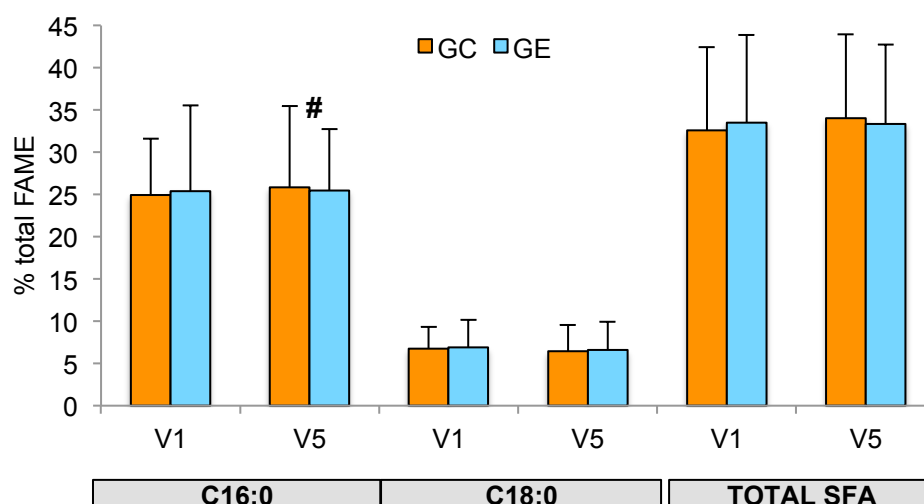
##### Plasma

El contenido total de SFA en el plasma de los voluntarios del ensayo clínico fue aproximadamente el 33% del total de FA, siendo los más abundantes el C16:0 (~25%), y el C18:0 (~7%), como se observa en la **Figura 5.2.1**. En cuanto a los FA C15:0 y C17:0, aunque no representaron más de un 0.2% del total de FA en el plasma, son considerados marcadores potenciales del consumo de grasa láctea, debido principalmente a su producción por la flora bacteriana en el rumen de los rumiantes. Razonablemente, el consumo regular de productos lácteos a lo largo de todo el ensayo clínico reflejó un contenido similar de los dos FA de cadena impar en ambos grupos (GC y GE). De la misma manera, se encontraron contenidos bajos del FA C14:0 (~0.5%) en todos los sujetos (**Tabla 5.2.1**).

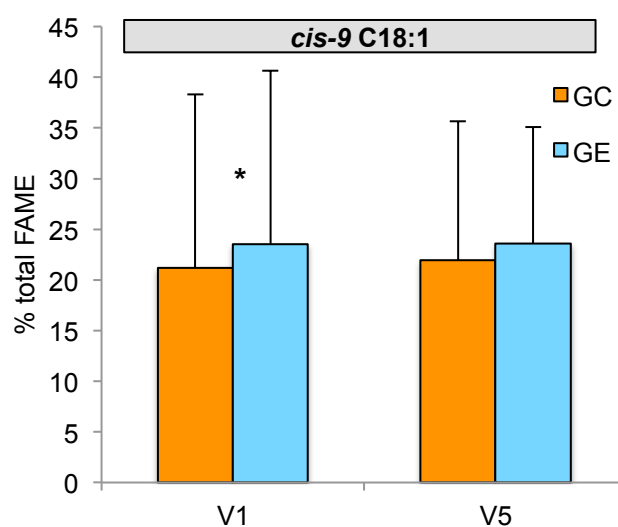
El contenido basal de MUFA en plasma, donde el ácido oleico (*cis*-9 C18:1) es el compuesto mayoritario (**Figura 5.2.2**), fue significativamente superior en el GE en comparación con el GC (21.2% vs. 23.5% del total de FA, respectivamente). Además, se cuantificaron otros FA minoritarios como el *cis*-11 C18:1 (~0.7%) y el ácido *trans*-palmitoleico (*trans*-7 C16:1) (~0.4%) (**Tabla 5.2.1**). Estos niveles son del mismo orden que los reportados en un ensayo clínico reciente de intervención nutricional de 8 semanas de duración en el que se analizó la composición plasmática de FA en 137 sujetos sanos con el objetivo de estudiar el efecto del consumo diario de 3 productos lácteos comerciales (leche, yogur y queso) (Abdullah *et al.*, 2015). Igualmente, el contenido basal plasmático de SFA y MUFA fue similar al encontrado por Dawczynski *et al.* (2013) en un ensayo clínico de 10 semanas de duración en el que se evaluó, en 53 voluntarios hipertriglicéridémicos, el consumo de 125 g/día de un yogur enriquecido con 0.8 o 3 gramos de PUFA procedente de aceite de pescado, frente a la ingesta de 125 g/día de yogur comercial.

Aunque los sujetos participantes en este estudio clínico fueron aleatorizados entre los dos grupos, el contenido basal de PUFA fue significativamente superior en el GE en comparación con el GC (44.2% vs 40.5% del total de FA, respectivamente) (**Figura 5.2.3**). El LA fue el PUFA mayoritario (~34%) en ambos grupos de intervención.



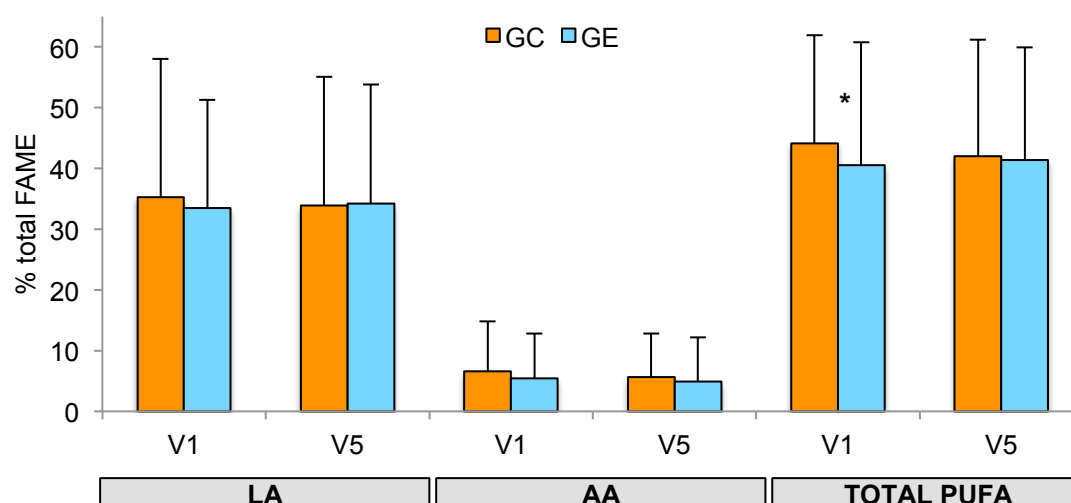


**Figura 5.2.1.** Contenido plasmático de C16:0, C18:0 y SFA de los voluntarios que consumieron el queso control (GC) y el queso enriquecido (GE) al principio (V1) y al final (V5) del período de intervención. Valores expresados como media  $\pm$  SD. #IC95% Diferencia significativa entre grupos al finalizar el ensayo clínico.



**Figura 5.2.2.** Contenido plasmático de *cis*-9 C18:1 en los voluntarios que consumieron el queso control (GC) y el queso enriquecido (GE) al principio (V1) y al final (V5) del período de intervención. Valores expresados como media  $\pm$  SD. \* Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t* de Student  $p < 0.05$ .

Además, se encontraron otros PUFA aunque en menor proporción, como AA (~5%), EPA (~0.2%) y DHA (~0.5%). Sin embargo, no se detectó la presencia de ALA y CLA en el plasma de los voluntarios de ninguno de los dos grupos. El contenido basal de LA, EPA y DHA de los voluntarios de este estudio fue similar al obtenido en un ensayo clínico de 6 semanas de duración en el que se analizó la composición lipídica del plasma de 99 sujetos sanos para evaluar el efecto de la ingesta 460 mg de PUFA en forma de aceite de pescado (Castro, 2007). Igualmente, el contenido plasmático del total de PUFA coincidió con el descrito por Dittrich *et al.* (2015) en un ensayo clínico de 10 semanas de duración en el que se evaluó, en 59 sujetos con hipertrigliceridemia, el efecto del consumo de aceites vegetales ricos en PUFA (lino, echium y microalgas) frente al consumo de aceite de girasol (rico en LA) sobre la composición lipídica.



**Figura 5.2.3.** Contenido plasmático de PUFA en los voluntarios que consumieron el queso control (GC) y el queso enriquecido (GE) al principio (V1) y al final (V5) del período de intervención. Valores expresados como media  $\pm$  SD. \* Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t* de Student  $p < 0.05$ .

El análisis estadístico de los cambios ocurridos en la composición lipídica plasmática entre ambos grupos de intervención a lo largo del ensayo clínico se muestra en la **Tabla 5.2.1**. El contenido de C16:0 disminuyó de manera significativa en el GE, debido probablemente al menor contenido de SFA presente en el QE y a la pérdida de peso que experimentaron los participantes en el estudio (Capítulo 5.1). Aunque el contenido total de SFA no disminuyó de manera significativa en el GE, la

magnitud del efecto del consumo del QE sobre la reducción de su contenido, y en particular de los niveles de C16:0, podría ser importante según indica *d de Cohen* (-0.5) y como se observa en la **Figura 5.2.4**. Sin embargo, los valores del cambio fueron altamente variables y eso provocó un intervalo de confianza muy amplio. Por otra parte, la ausencia de diferencias significativas en el contenido plasmático de los FA C14:0, C18:0 y del total de SFA entre grupos, podría deberse a la síntesis *de novo* de la mayoría de los SFA o la desaturación endógena de C14:0 y C18:0 a MUFA, como han descrito previamente Nakamura y Nara (2004). Consecuentemente, el incremento en el nivel plasmático de SFA reportado por otros autores en ensayos clínicos de suplementación en humanos podría, pero no necesariamente, representar el consumo de SFA en la dieta (Abdullah *et al.*, 2015).

Debido al consumo regular de queso y de otros productos lácteos durante toda la intervención, el contenido plasmático de los FA C15:0 y C17:0 se mantuvo estable en ambos grupos. La presencia en el plasma estos biomarcadores de la ingesta de grasa láctea se describió también en un ensayo clínico de 1 mes de duración en el que se estudió la composición lipídica plasmática de 180 voluntarios que se aleatorizaron para aumentar, disminuir o no modificar la ingesta de productos lácteos elaborados a partir de leche entera. Al finalizar el estudio, el contenido en FA de cadena impar se vio aumentado únicamente en aquellos sujetos que consumieron grasa láctea (Benatar *et al.* 2014). Según un estudio longitudinal prospectivo de 10 años de duración (1992-2006) realizado por Mozaffarian *et al.* (2010), el contenido plasmático del FA *trans*-7 C16:1 podría ser también considerado un biomarcador de la ingesta de grasa láctea. Tras comparar, en 327 sujetos, la incidencia de padecer diabetes tipo II y mayor riesgo metabólico frente al contenido plasmático de *trans*-7 C16:1, estos autores concluyeron que una elevada concentración plasmática de este ácido se asociaba con un menor contenido de algunos marcadores de inflamación como la CRP, una menor adiposidad, niveles elevados de HDL y, consecuentemente, una aparición sustancialmente menor de diabetes tipo II.

En cuanto al contenido total de MUFA, éste disminuyó de manera significativa en el plasma del GE en comparación con el GC. Además, la magnitud del efecto de la reducción de MUFA, y más específicamente, del FA *cis*-9 C18:1, demostró ser robusta según *d de Cohen* (-0.5), tal y como se observa en la **Figura 5.2.4**. La reducción de MUFA podría ser debida al elevado consumo de PUFA en el GE. Asimismo, en un ensayo clínico reciente de 6 semanas de duración (n=33), el consumo de aceite de pescado disminuyó de manera significativa el contenido plasmático de *cis*-9 C18:1 tanto en aquellos voluntarios que realizaron una dieta alta en SFA, como en los sujetos que consumieron una dieta elevada en FA n6 (Días *et al.*, 2016).

Al finalizar el ensayo clínico, el contenido total de PUFA aumentó de manera significativa en el grupo que consumió el QE, debido fundamentalmente al incremento, también significativo, del contenido de LA, así como del total de FA n6, en el GE (**Tabla 5.2.1**). Estos resultados no fueron sorprendentes si se tiene en cuenta la composición dinámica del plasma, caracterizada por una continua entrada y salida de FA (Goyens *et al.*, 2006). Asimismo, la magnitud del aumento significativo de estos FA fue, además, relevante según *d de Cohen* (-0.5), tal y como se observa en la **Figura 5.2.4**.

Por otro lado, la ausencia de ALA, CLA y el bajo contenido plasmático de EPA y DHA detectado en ambos grupos, se mantuvo estable hasta finalizar el período de intervención. En una revisión reciente, Baker *et al.* (2016) describieron los efectos metabólicos y funcionales de los FA n3 procedentes de diversas fuentes de origen vegetal (lino, colza, camelia, nueces, echium y sésamo). Una vez consumido, el ALA es absorbido a nivel intestinal y sigue tres posibles rutas metabólicas: el almacenamiento, que se produce principalmente en el tejido adiposo; la  $\beta$ -oxidación hepática (60-85% del ALA absorbido); y/o la conversión a EPA y DHA, la cual ocurre principalmente en el hígado y de manera minoritaria en el cerebro. Además, existen otros factores que pueden limitar el paso de ALA al torrente sanguíneo en los ensayos clínicos de suplementación, como son la variabilidad de la dieta, la duración y el cumplimiento del tratamiento, las diferencias en la capacidad de conversión (polimorfismos), el acceso a los tejidos en los que se realiza el análisis y la presencia de patologías que alteren la capacidad de conversión, como un mayor porcentaje de tejido adiposo (sobrepeso y obesidad) (Morales *et al.*, 2012). La no presencia de ALA y CLA se halla en consonancia con los resultados de un ensayo clínico de 4 semanas de duración, en el que se evaluó, en 30 voluntarios sanos, el efecto del consumo de 50 g/día de queso de vaca enriquecido de manera natural con aceite de lino sobre la composición lipídica del plasma y eritrocitos (Intorre *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, el aumento del nivel plasmático de LA determinado en este estudio podría competir metabólicamente con ALA. El exceso de una familia de FA, en este caso FA n6, podría interferir con el metabolismo de ALA, modificar sus concentraciones en los tejidos e inhibir así la conversión de ALA en EPA (Goyens *et al.*, 2006). Por lo tanto, no existe una relación dosis-respuesta establecida ni para la presencia de ALA en plasma y eritrocitos ni para la biosíntesis de EPA y DHA a partir de este precursor. Asimismo, estos datos parecen corresponderse con los descritos en un ensayo clínico de 90 días en el que se evaluó, en 160 voluntarios, el consumo de productos de origen animal enriquecidos con un 5% de lino extrusionado (productos lácteos, carne y huevos). En este estudio, Legrand *et al.* (2010) sugirieron que el bajo contenido sanguíneo de EPA

y DHA podría deberse, como se ha descrito, a la necesidad de cantidades elevadas de FA n3 en personas con sobrepeso y obesidad debido a un mayor catabolismo de este FA, el cual realiza funciones importantes en la conservación de los tejidos. De la misma manera, Arterburn *et al.* (2006), en un estudio sobre la distribución, la interconversión y la respuesta del organismo al consumo de diferentes dosis de FA n3, concluyeron que podría ser necesaria una mayor duración de la intervención nutricional con suplementación de PUFA para aumentar de manera significativa el contenido plasmático de ALA, EPA y DHA, debido principalmente al catabolismo de ALA a través de la  $\beta$ -oxidación para obtener energía.

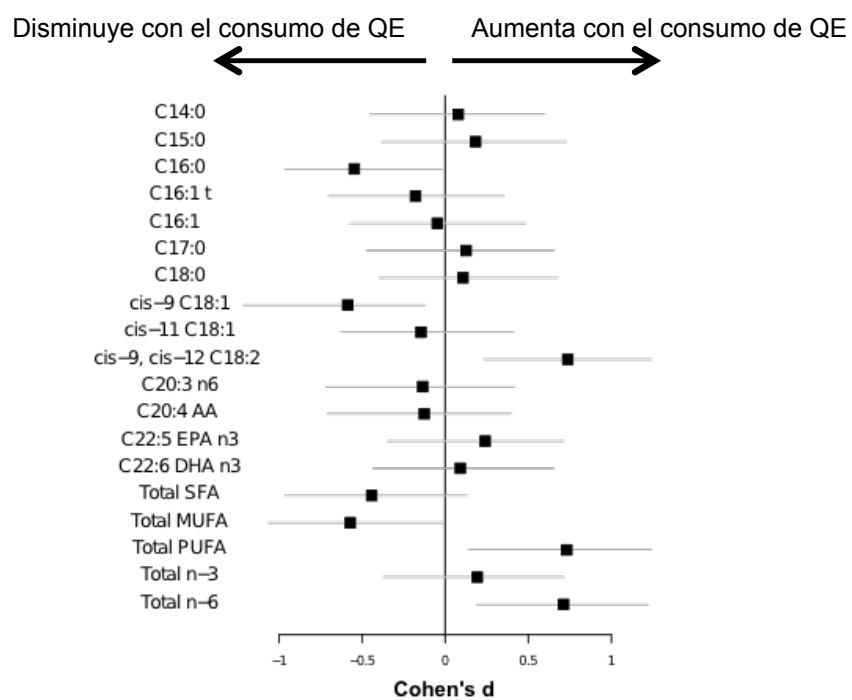
Respecto a la ausencia de CLA, Salas-Salvadó *et al.* (2006) sugirieron que factores como el tamaño muestral, el sexo, el estado nutricional (normopeso o sobrepeso) y fisiopatológico de los sujetos (dislipemia, hipertensión arterial, síndrome metabólico), el control de la dieta durante la intervención, la dosis, la composición de los diferentes isómeros de CLA y la duración del estudio podrían influir decisivamente en los niveles detectados de dicho FA. La ausencia de diferencias significativas, tanto en la composición del perfil lipídico como en la composición corporal cuando el CLA es incorporado de manera natural en diferentes productos lácteos, ha sido previamente reportada en otros estudios clínicos realizados en sujetos con sobrepeso, obesidad e hiperlipidemia (Desroches *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2011). Además, en una revisión sobre los efectos del consumo de CLA en el metabolismo humano, Yang *et al.* (2015) concluyeron que sería necesaria una ingesta diaria de 3-4 g/día de CLA en una proporción 50:50 de los dos isómeros principales (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12) para producir una mejora en la reducción de grasa abdominal, pero esta cantidad de CLA podría no afectar a otros parámetros metabólicos como su presencia en plasma y eritrocitos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio podrían haberse debido a un tiempo corto de intervención y/o a la necesidad del consumo de una dosis más elevada de CLA en personas con sobrepeso y obesidad. Consecuentemente, son necesarios más ensayos clínicos a largo plazo para evaluar la eficacia tanto del CLA como de sus isómeros en humanos.

**Tabla 5.2.1.** Análisis estadístico de los cambios de la composición lipídica del plasma de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) entre el principio (V1) y el final (V5) del ensayo clínico.

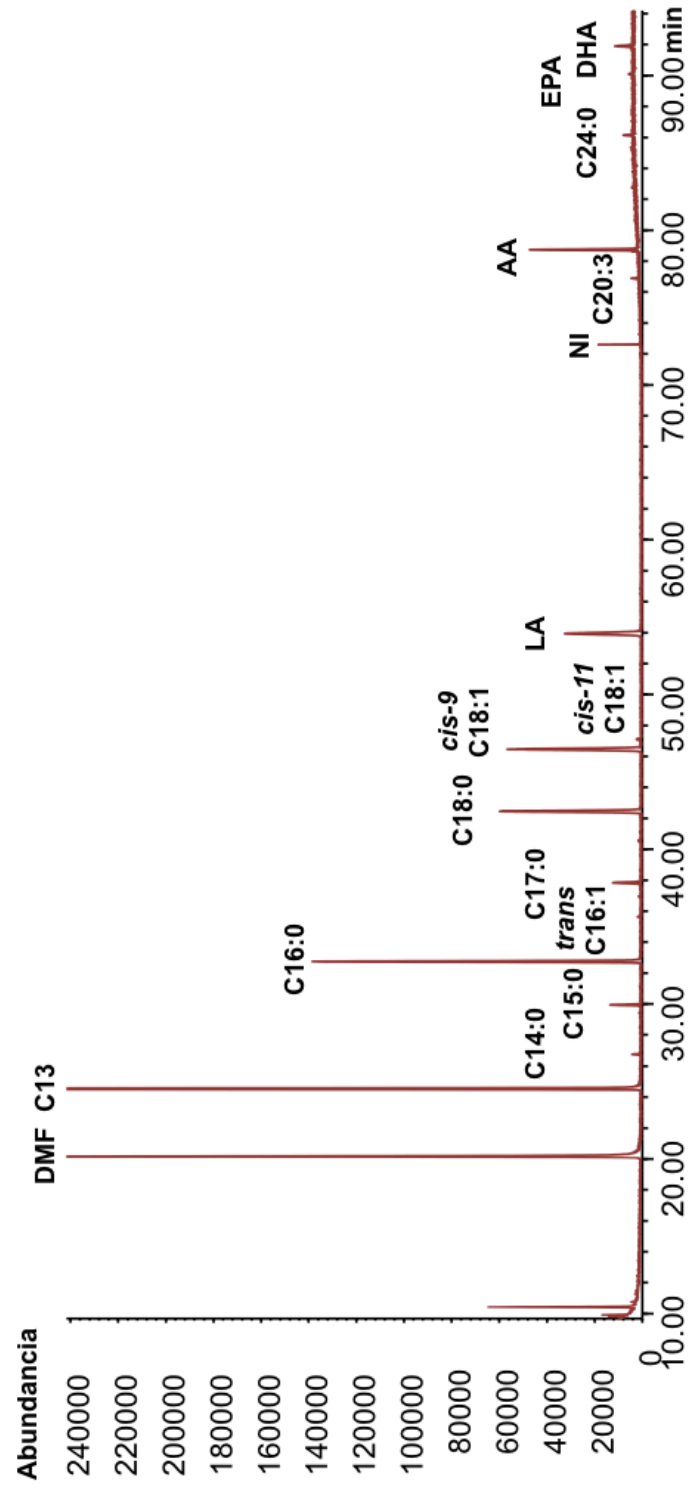
% del total de FA	V1			V5			V5-V1		
	GC	GE	P*	GC	GE		GC	GE	IC95%
C14:0	0.56 ± 1.04	0.6 ± 0.96	0.457	0.62 ± 0.81	0.65 ± 0.82		0.05 (-0.93;0.64)	0.02 (-0.38;0.51)	0.02 (-0.1;0.16)
C15:0	0.11 ± 0.11	0.11 ± 0.17	0.873	0.11 ± 0.13	0.12 ± 0.15		0 (-0.04;0.05)	0.01 (-0.06;0.08)	0 (-0.01;0.02)
C16:0	24.93 ± 6.67	25.41 ± 10.17	0.238	25.87 ± 9.62	25.5 ± 7.26		0.38 (-3.78;7.72)	-0.09 (-3.18;3.17)	-1.07 (-2.15;-0.14) #
<i>trans</i> -7 C16:1	0.47 ± 1.55	0.35 ± 3.06	0.484	0.49 ± 1.25	0.41 ± 3.05		0.01 (-0.58;0.62)	-0.01 (-0.52;0.31)	-0.04 (-0.15;0.06)
C17:0	0.11 ± 0.12	0.11 ± 0.16	0.738	0.10 ± 0.17	0.11 ± 0.13		0 (-0.11;0.06)	0 (-0.05;0.12)	0 (-0.01;0.02)
C18:0	6.78 ± 2.58	6.88 ± 3.25	0.714	6.46 ± 3.09	6.62 ± 3.28		-0.21 (-2.21;1.64)	-0.13 (-1.52;2.19)	0.08 (-0.27;0.56)
<i>cis</i> -9 C18:1	21.20 ± 17.11	23.55 ± 17.11	0.015 *	21.93 ± 13.70	23.61 ± 11.51		0.95 (-5.67;6.96)	-0.08 (-9.8;3.75)	-1.71 (-3.45;-0.42) #
<i>cis</i> -11 C18:1	0.68 ± 1.53	0.76 ± 0.92	0.465	0.77 ± 1.13	0.69 ± 1.03		0 (-0.71;0.61)	-0.03 (-0.36;0.22)	-0.03 (-0.15;0.08)
LA	35.23 ± 22.79	33.49 ± 17.78	0.05	33.89 ± 21.19	34.24 ± 19.53		-0.5 (-13.57;7)	0.85 (-5.52;10.41)	2.86 (1;5.16) #
C20:3	0.68 ± 1.53	0.87 ± 1.44	0.074	0.61 ± 1.40	0.75 ± 1.22		-0.04 (-1.7;0.55)	-0.07 (-0.96;0.17)	-0.04 (-0.18;0.14)
AA	6.55 ± 8.29	5.48 ± 7.33	0.271	5.64 ± 7.13	4.92 ± 7.24		0.02 (-4.77;2.32)	-0.24 (-1.32;1.24)	-0.14 (-0.67;0.47)
EPA	0.20 ± 0.89	0.15 ± 0.60	0.079	0.18 ± 0.77	0.17 ± 0.50		0 (-0.89;0.45)	0 (-0.6;0.36)	0.05 (-0.07;0.16)
DHA	0.57 ± 1.44	0.46 ± 0.98	0.253	0.64 ± 1.40	0.56 ± 1.08		0.07 (-0.57;0.44)	0.07 (-0.45;0.38)	0.02 (-0.09;0.14)
ΣSFA	32.60 ± 9.81	33.51 ± 9.88	0.26	34.06 ± 10.36	33.34 ± 9.43		0.47 (-5.63;6.86)	0.08 (-4.07;3.21)	-0.96 (-2.05;0.17)
ΣMUFA	22.57 ± 17.61	24.67 ± 16.91	0.019 *	23.63 ± 14.66	24.93 ± 12.18		0.47 (-6.39;8.04)	-0.08 (-9.85;4.06)	-1.79 (-3.62;-0.13) #
ΣPUFA	44.15 ± 17.74	40.52 ± 20.25	0.018 *	42.05 ± 19.15	41.30 ± 18.59		-0.98 (-11.65;6.54)	0.76 (-6.77;10.56)	2.74 (0.74;4.99) #
Total n3	0.65 ± 1.86	0.62 ± 1.58	0.131	0.86 ± 2.17	0.69 ± 1.59		0.02 (-0.85;0.7)	0.08 (-0.8;0.59)	0.07 (-0.13;0.25)
Total n6	42.97 ± 18.57	40.01 ± 20.21	0.025	40.78 ± 18.55	40.40 ± 18.28		-0.9 (-11.79;6.7)	0.92 (-6.82;10.07)	2.67 (0.76;4.7) #

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t* de Student  $p < 0.05$ .

# IC95% significativa de la diferencia de los cambios absolutos entre grupos al finalizar el ensayo clínico.



**Figura 5.2.4.** Magnitud del efecto (*d de Cohen*) del consumo del QE sobre los FA plasmáticos.



**Figura 5.2.5.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS de los FAME de la fracción lipídica extraída del plasma de un voluntario del ensayo clínico. DMF N, N-dimetilformamida; NI no identificado.

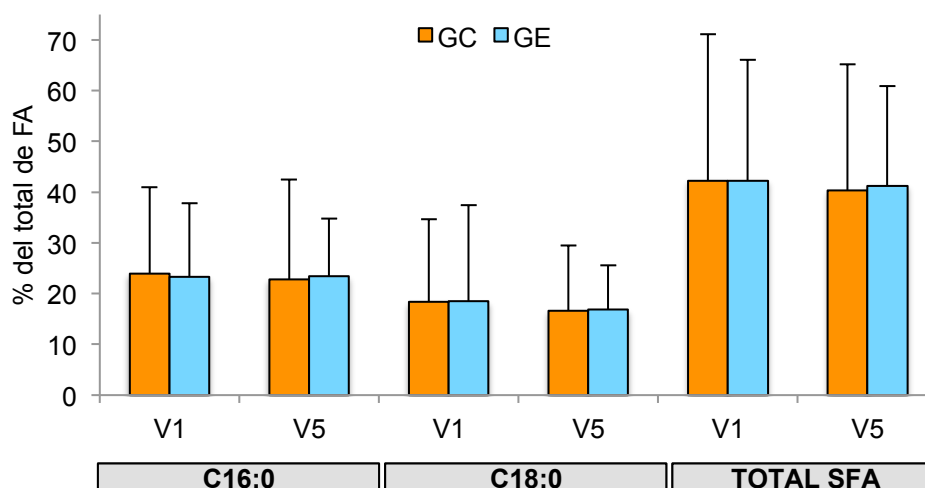


## Eritrocitos

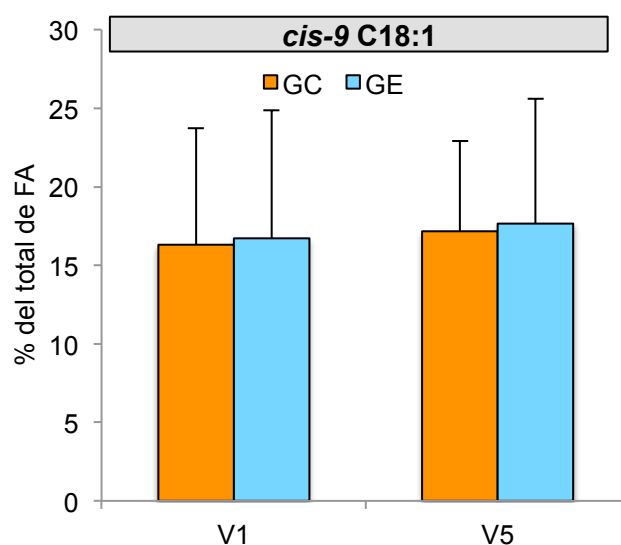
La composición lipídica en los eritrocitos es el resultado de la ingesta de lípidos y el correcto funcionamiento del metabolismo lipídico. Por lo tanto, reflejan mejor el estado del organismo respecto al metabolismo de síntesis, degradación e interconversión entre los distintos FA (Cortés-Castell *et al.*, 2013). Aunque el hecho de que el enriquecimiento de la dieta en PUFA puede modificar la composición lipídica de plasma y eritrocitos mejorando los factores asociados al CVR ha sido ampliamente demostrado (Mika *et al.*, 2017), la esterificación de los FA de los eritrocitos le confiere una fuerte estabilidad en comparación con los FA del plasma, que serían más fácilmente modificables (Intorre *et al.*, 2013). Además, la composición lipídica sanguínea representa una fuente de información sobre las alteraciones relacionadas con el síndrome metabólico.

El contenido total de SFA fue aproximadamente el 42% del total de FA en todos los voluntarios participantes del ensayo clínico, de los que los FA C16:0 (~23%) y C18:0 (~18%) fueron los mayoritarios, como se observa en la **Figura 5.2.6**. Igualmente, se determinó un contenido inferior del FA C14:0 (~0.3%). Además, aunque el contenido de los FA C15:0 y C17:0 en los eritrocitos de los voluntarios fue levemente superior al cuantificado en las muestras de plasma, su concentración no alcanzó más del 0.2% del total de FA (**Tabla 5.2.2**). Por otro lado, el contenido en ácido oleico (*cis*-9 C18:1) fue elevado en todas las muestras de eritrocitos analizadas (15-20% del total de FA). Sin embargo, al contrario de lo observado en las muestras de plasma, no se observaron diferencias entre grupos en el contenido basal de ácido oleico en los eritrocitos (**Figura 5.2.7**). De la misma manera, el contenido de MUFA coincidió con un estudio prospectivo en el que se analizó la composición lipídica de 493 sujetos para evaluar la relación entre el consumo de productos lácteos y el riesgo de sufrir cardiopatía isquémica (Sun *et al.*, 2007). Igualmente, el contenido de MUFA basal coincidió con el descrito en un ensayo clínico de intervención nutricional de 6 meses de duración en el que se evaluó, en 86 sujetos hipertrigliceridémicos, el consumo de 1 g/día de EPA y DHA procedente de aceite de pescado en la composición lipídica de los eritrocitos (Murphy *et al.*, 2007).

Por último, el contenido basal de PUFA en eritrocitos fue aproximadamente el 38% del total de FA en ambos grupos (**Figura 5.2.8**). El AA (~16%) y el LA (~14%) fueron los PUFA mayoritarios, mientras que los niveles de otros PUFA, como EPA (~0.4%), DHA (~3%) y DPA (~0.9%) fueron inferiores (**Tabla 5.2.2**).

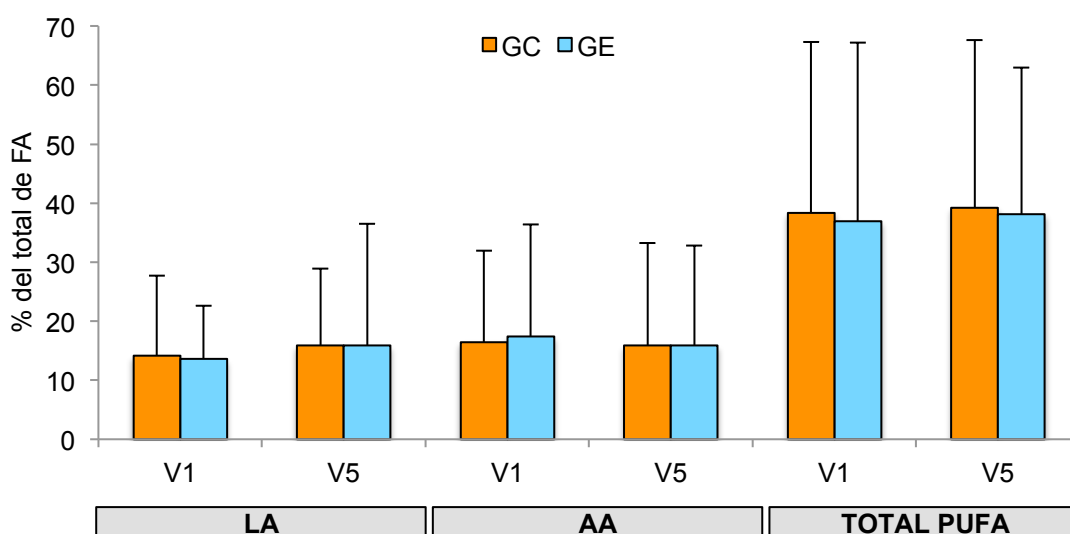


**Figura 5.2.6.** Contenido de los principales SFA en los eritrocitos de los voluntarios que consumieron el queso control (GC) y el queso enriquecido (GE) al principio (V1) y al final (V5) del período de intervención. Valores expresados como media  $\pm$  SD.



**Figura 5.2.7.** Contenido de *cis*-9 C18:1 en los eritrocitos de los voluntarios que consumieron el queso control (GC) y el queso enriquecido (GE) al principio (V1) y al final (V5) del período de intervención. Valores expresados como media  $\pm$  SD.

Estos resultados coincidieron con los obtenidos en un ensayo clínico de intervención nutricional de 3 meses de duración en el que se comparó, en 101 voluntarios hipertrigliceridémicos, el efecto del consumo de 250 ml/día de leche desnatada enriquecida en ALA, LA, fitoesteroles y vitaminas, con el consumo de leche control o con la ausencia del consumo de leche sobre la composición lipídica de los eritrocitos (Petrogianni *et al.*, 2014).



**Figura 5.2.8.** Contenido de los principales PUFA en los eritrocitos de los voluntarios que consumieron el queso control (GC) y el queso enriquecido (GE) al principio (V1) y al final (V5) del período de intervención. Valores expresados como media  $\pm$  SD.

El análisis estadístico de los cambios ocurridos en la composición lipídica de los eritrocitos entre ambos grupos a lo largo del ensayo clínico se muestra en la **Tabla 5.2.2**. Al finalizar la intervención, el contenido de los principales SFA no se modificó de manera significativa en función del tratamiento asignado, debido fundamentalmente al contenido estable de los SFA mayoritarios (C16:0 y C18:0). Por el contrario, el contenido del FA C14:0, un FA presente de manera natural en la grasa láctea, aumentó significativamente en el GE (**Tabla 5.2.2**). La magnitud de este aumento fue grande según *d* de Cohen ( $-0.5$ ) (**Figura 5.2.9**). No obstante, dado que el contenido analizado de este FA en los eritrocitos no superó, en ninguno de los grupos, el 0.35% del total de FA, este incremento podría ser debido a las diferencias basales entre grupos. En contraste, la presencia de los FA C15:0 y C17:0 se mantuvo estable al final del ensayo clínico sin observarse diferencias significativas en su contenido en función

del grupo de tratamiento (**Tabla 5.2.2**). Esta ausencia de diferencias significativas coincidió los resultados obtenidos por Venkatraman *et al.* (2010) en un ensayo clínico cruzado de 3 períodos de 8 semanas de duración, en el que se comparó, en voluntarios con sobrepeso e hiperlipidemia, el consumo de leche enriquecida de manera natural en CLA (1.3 g/día), leche enriquecida con una mezcla sintética de CLA (1.3 g/día) y leche control (0.2 g de CLA/día).

Por otro lado, el contenido total de MUFA se mantuvo estable en los dos grupos al finalizar el período de intervención (**Figura 5.2.7**). Tal y como se observa en la **Tabla 5.2.2**, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ácido oleico entre grupos. En cambio, el contenido de *cis-11* C18:1, un isómero minoritario del C18:1, aumentó de manera significativa en el grupo que consumió el QE, en comparación con el GC. La magnitud del aumento de este FA fue, además, importante (*d de Cohen* entorno a 0.5), tal y como se observa en la **Figura 5.2.9**. No se ha reportado previamente la identificación de este FA en la composición lipídica de eritrocitos en ensayos clínicos en humanos. No obstante, en un ensayo clínico reciente de 3 meses de duración donde se evaluó, en 461 pacientes con síndrome metabólico, el efecto del consumo de 1 g/día de FA n3 (850 mg de EPA+DHA) o de aceite de oliva, Harris *et al.* (2016) no hallaron diferencias significativas ni en el contenido de *cis-9* C18:1 entre grupos ni en el de ninguno de los isómeros del FA C18:1 analizados. Por lo tanto, y de la misma manera que sucedió con el FA C14:0, el aumento significativo del contenido de este FA en el GE podría ser debido a las diferencias basales significativas entre grupos al principio del estudio y no al efecto de los diferentes tratamientos.

Por último, el contenido basal de PUFA en los eritrocitos, como LA, AA y, en menor medida, EPA, DHA y DPA, no difirió de manera significativa entre grupos al principio del período de intervención (V1). Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias en el contenido de los PUFA analizados en función del tiempo y del tratamiento asignado al finalizar el ensayo clínico (**Tabla 5.2.2**). Esta estabilidad en las concentraciones de EPA y DHA en los eritrocitos de los voluntarios podría ser debida, como se explicó anteriormente, al elevado catabolismo de ALA para la obtención de energía ( $\beta$ -oxidación) y/o a su almacenamiento en el tejido adiposo, lo que produciría consecuentemente una baja conversión de ALA en EPA y DHA. En un estudio multicéntrico que se llevó a cabo en 163 adultos sanos, los cuales no consumían suplementos de aceite de pescado, Sands *et al.* (2005) concluyeron que no sólo el consumo de FA n3 podría influir significativamente e independientemente en el contenido total de PUFA en los eritrocitos, sino también la edad, el BMI y otras enfermedades como la diabetes mellitus. Aunque un aumento de PUFA en los

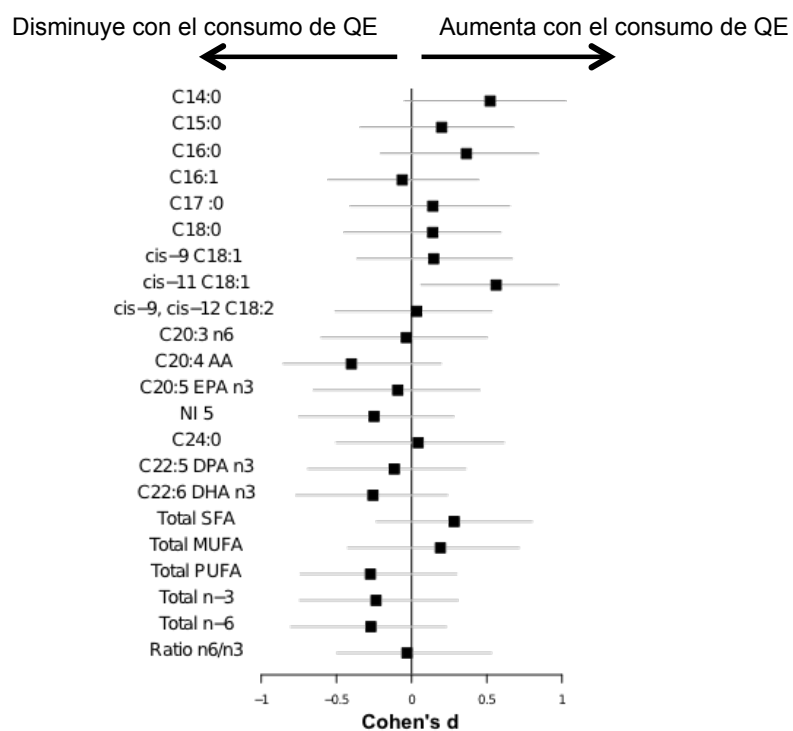
eritrocitos podría disminuir la adiposidad debido a la reducción de la síntesis de grasa y al incremento del metabolismo adiposo (Howe *et al.*, 2014), son necesarios más estudios clínicos en los que se evalúe la dosis eficiente de PUFA en estudios de suplementación en humanos (Arterburn *et al.*, 2006). Esta hipótesis está en consonancia con los resultados obtenidos en un ensayo clínico cruzado reciente en el que se evaluó, durante 3 períodos de 3 semanas, el efecto del consumo de 45 o 90 g/día de queso de oveja naturalmente enriquecido en CLA, TVA y ALA en la composición lipídica de 42 sujetos hipertrigliceridémicos. El contenido de PUFA sólo se vio incrementado de manera significativa cuando se consumió la dosis elevada del producto lácteo (Pintus *et al.*, 2013). Además, estas necesidades podrían verse aumentadas por otros factores, como el tipo de población, las características basales y el diseño del estudio (Dawczynski *et al.*, 2013). Estos estudios ponen de manifiesto que sería necesaria la realización de más estudios para estandarizar la medición de los biomarcadores lipídicos en eritrocitos y así definir los niveles recomendables del consumo de grasa dietética para mantener un estado óptimo de salud.

**Tabla 5.2.2.** Análisis estadístico de la composición lipídica de los eritrocitos de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) al principio (V1) y al final (V5) del ensayo clínico.

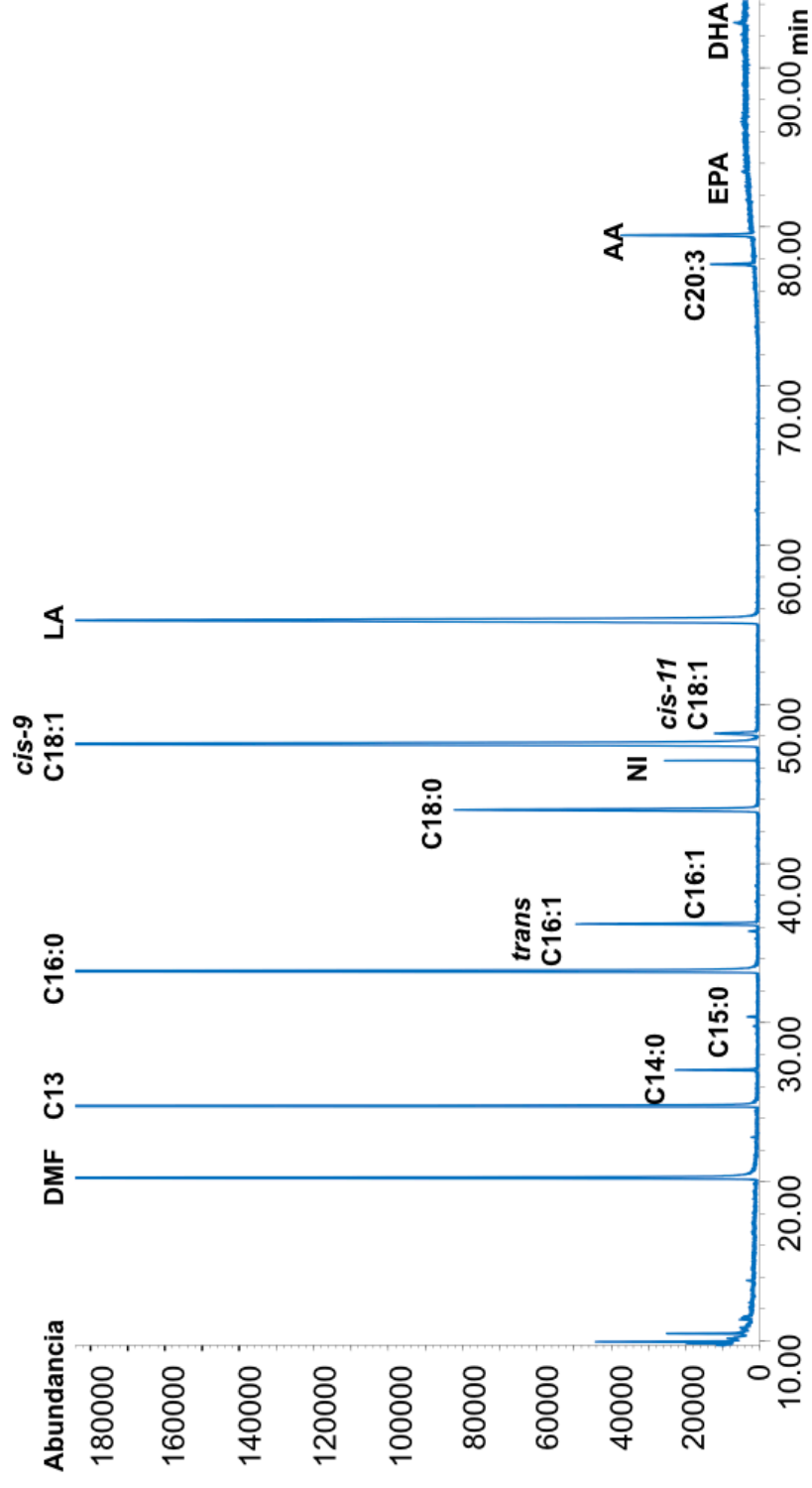
% del total de FA	V1			V5			V5-V1		
	GC	GE	P*	GC	GE		GC	GE	IC95%
C14:0	0.32 ± 0.45	0.25 ± 0.49	0.005 *	0.28 ± 0.50	0.28 ± 0.77		-0.01 (-0.34;0.25)	0.06 (-0.26;0.41)	0.07 (0;0.14) #
C15:0	0.14 ± 0.35	0.12 ± 0.30	0.108	0.15 ± 0.30	0.13 ± 0.47		0 (-0.35;0.3)	0.01 (-0.12;0.47)	0.02 (-0.02;0.09)
C16:0	23.99 ± 16.92	23.33 ± 14.53	0.195	22.86 ± 19.65	23.41 ± 11.34		-0.18 (-15.36;11.51)	0.24 (-8.64;9.07)	1.72 (-0.7;4.11)
cis-9 C16:1	0.27 ± 0.86	0.22 ± 0.89	0.485	0.32 ± 0.87	0.31 ± 0.77		0.06 (-0.42;0.53)	0.06 (-0.2;0.44)	-0.01 (-0.09;0.07)
C17:0	0.22 ± 0.35	0.17 ± 0.41	0.534	0.17 ± 0.36	0.17 ± 0.44		0 (-0.35;0.24)	0.02 (-0.28;0.28)	0.02 (-0.04;0.07)
C18:0	18.36 ± 16.31	18.47 ± 12.8	0.325	16.67 ± 12.85	16.85 ± 8.68		-1.32 (-15.56;8.17)	-1.33 (-12.09;5.76)	0.64 (-1.76;2.8)
cis-9 C18:1	16.32 ± 7.40	16.72 ± 8.14	0.654	17.18 ± 5.74	17.64 ± 7.87		0.61 (-3.43;3.87)	0.58 (-4.18;6.15)	0.28 (-0.65;1.32)
cis-11 C18:1	0.79 ± 0.77	0.75 ± 0.94	0.031 *	0.82 ± 0.60	0.76 ± 0.89		0.05 (-0.5;0.26)	0.07 (-0.36;1.07)	0.12 (0.03;0.26) #
LA	14.13 ± 13.63	13.57 ± 9.04	0.95	15.87 ± 13.03	15.86 ± 20.64		1.2 (-5.38;10.21)	2.31 (-11.05;8.96)	0.12 (-2.15;1.68)
C20:3	1.20 ± 5.68	1.45 ± 3.06	0.428	1.19 ± 1.56	1.29 ± 2.18		-0.11 (-3.92;1)	-0.16 (-1.58;0.71)	-0.02 (-0.29;0.45)
AA	16.37 ± 15.46	17.43 ± 18.98	0.081	16.82 ± 17.37	15.89 ± 17		0.24 (-11.47;14.38)	-0.93 (-14.66;13.55)	-2.31 (-5.26;0.7)
EPA	0.35 ± 0.99	0.41 ± 3.03	0.353	0.43 ± 2.55	0.35 ± 2.73		0.05 (-0.7;2.55)	0.02 (-3.03;2.73)	-0.07 (-0.54;0.31)
C24:0	0.17 ± 0.71	0.10 ± 1.73	0.348	0.22 ± 1.14	0.10 ± 1.70		0 (-0.71;1.14)	0 (-0.55;1.35)	0.01 (-0.17;0.2)
DPA	0.92 ± 1.58	0.82 ± 1.73	0.839	0.92 ± 1.87	0.87 ± 2.28		0 (-0.92;1.87)	0.03 (-1.08;1.27)	-0.06 (-0.36;0.17)
DHA	2.94 ± 4.87	2.80 ± 4.67	0.931	3.35 ± 5.66	3.21 ± 4.06		0.44 (-2.87;3.95)	0.21 (-2.44;2.77)	-0.33 (-0.98;0.28)
ΣSFA	42.27 ± 28.68	42.27 ± 23.78	0.183	40.36 ± 24.87	41.28 ± 19.59		-0.97 (-27.83;19.75)	-0.57 (-18.85;14.42)	2.49 (-1.8;7.18)
ΣMUFA	17.43 ± 8.30	17.98 ± 8.92	0.903	18.26 ± 6.90	18.99 ± 8.43		0.56 (-3.3;4.21)	0.72 (-4.33;6.95)	0.39 (-0.78;1.47)
ΣPUFA	38.33 ± 29.01	36.93 ± 30.23	0.235	39.22 ± 28.4	38.17 ± 24.78		0.98 (-22.23;28.99)	0.71 (-18.09;21.6)	-2.68 (-7.6;2.17)
Total n3	4.39 ± 6.83	4.49 ± 6.73	0.767	4.73 ± 7.82	4.58 ± 6.77		0.58 (-4;5.02)	0.36 (-5.96;3.95)	-0.46 (-1.53;0.48)
Total n6	33.17 ± 25.33	32.37 ± 25.83	0.18	33.71 ± 22.66	33.8 ± 20.38		0.65 (-18.22;24.59)	0.65 (-15.1;17.65)	-2.22 (-6.73;1.46)
n6/n3	7.86 ± 16.13	7.88 ± 21.96	0.903	7.12 ± 28.38	7.48 ± 16.16		-0.3 (-9.97;24.12)	-0.35 (-19.66;14.87)	-0.18 (-3.7;2.29)

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p < 0.05$ .

# IC95% significativa de la diferencia de los cambios absolutos entre grupos al finalizar el ensayo clínico.



**Figura 5.2.9.** Magnitud del efecto (*d de Cohen*) del consumo del QE sobre los FA de los eritrocitos.



**Figura 5.2.10.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS de los FAME de la fracción lipídica extraída de los eritrocitos de un voluntario del ensayo clínico. DMF N, N-dimetilformamida; NI no identificado.



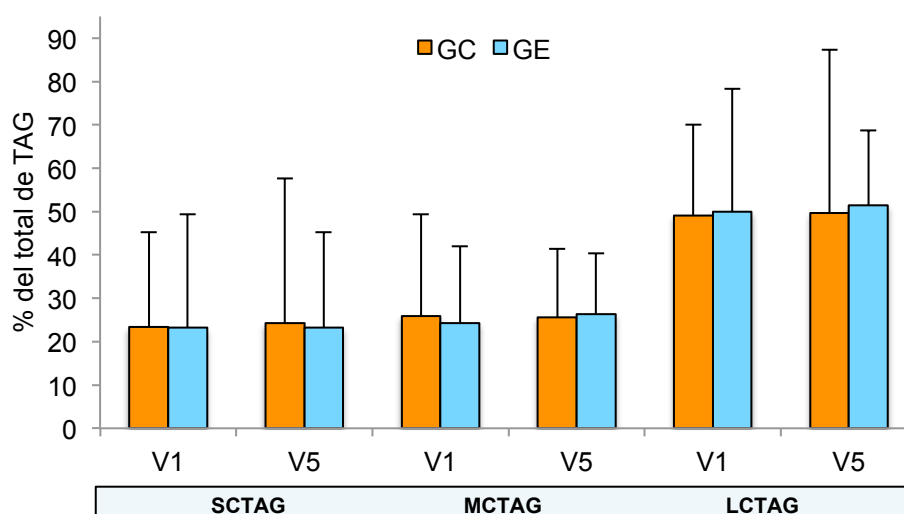
### 5.2.3.2. Composición de grupos de triglicéridos por número de átomos de carbono en plasma y eritrocitos

#### Plasma

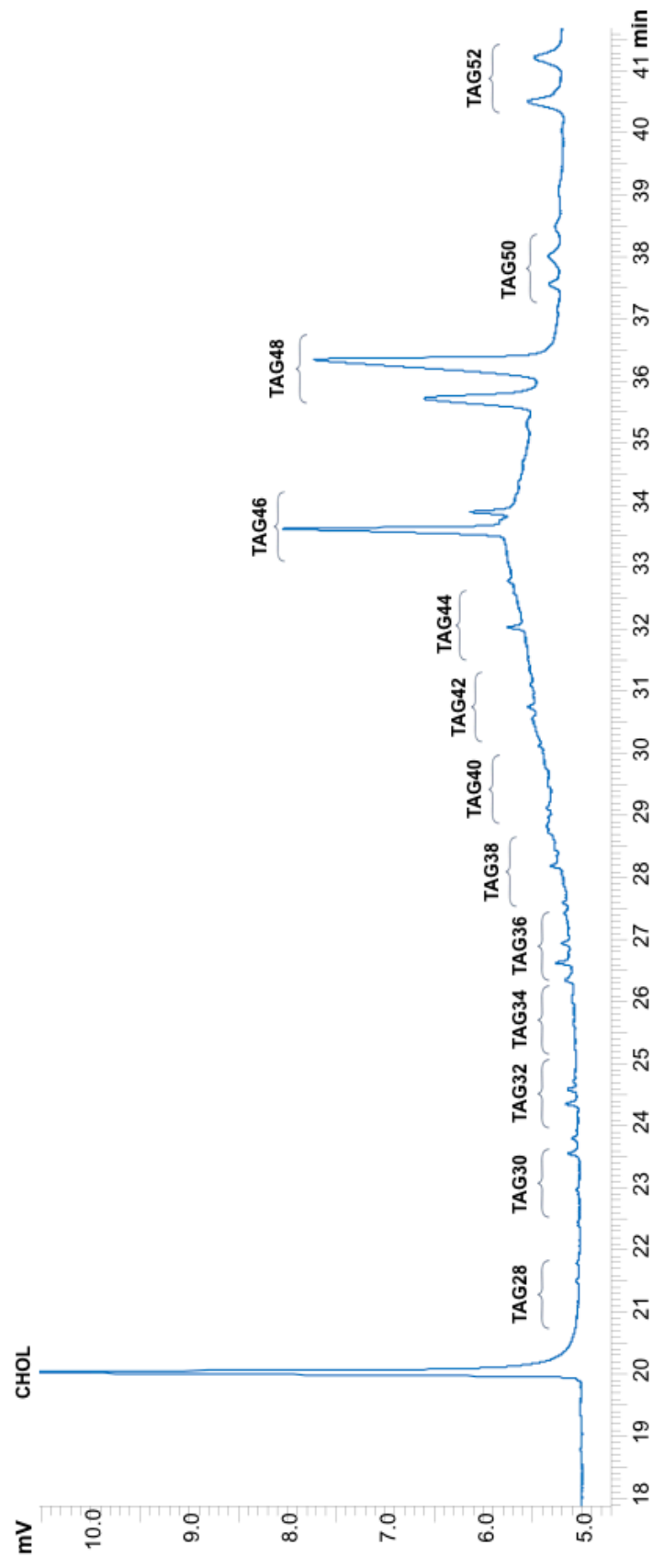
Como se explicó en el Capítulo 5.1, la determinación clínica del contenido en TAG ha sido ampliamente empleada como biomarcador plasmático del estado de CVR de un individuo. Sin embargo, la evaluación del efecto de un tratamiento sobre la distribución de los grupos de TAG en plasma y eritrocitos ha sido escasamente estudiada en la bibliografía. El método utilizado para el análisis (Fontecha *et al.*, 2005) permitió la cuantificación de 14 grupos de TAG en las muestras de plasma (de 28CN a 54CN) (**Tabla 5.2.3**). En el presente estudio, las muestras de plasma del GC y GE mostraron una distribución similar de los grupos de TAG al principio y al final del ensayo clínico, alcanzando el primer máximo en CN48, y el segundo máximo en CN46. No se observaron diferencias significativas en la distribución basal media de TAG en función de la longitud de cadena corta (SCTAG; CN26-CN34), media (MCTAG; CN36-CN44) y larga (LCTAG; CN46-CN54) en el GC (23.3%, 25.9% y 49.1% respectivamente) en comparación con el GE (23.1%, 24.3% y 49.9% respectivamente) (**Figura 5.2.11**). Al finalizar el ensayo clínico, la distribución media de TAG en el GC se mantuvo estable (24.2%, 25.5% y 49.7% respectivamente). Sin embargo, el perfil de los grupos de TAG analizados en el GE presentó un mayor contenido de MCTAG (26.4%) y LCTAG (51.4%), debido al ligero incremento de CN42-44, y CN52-54 (**Figura 5.2.11**).

El análisis estadístico de los cambios ocurridos en la composición de TAG en las muestras de plasma entre ambos grupos de intervención a lo largo del ensayo clínico se muestra en la **Tabla 5.2.3**. Estos resultados no mostraron diferencias significativas en la composición de los principales grupos de TAG en el GE en comparación con el GC. El análisis de los diferentes grupos de TAG ha demostrado ser de especial interés en el desarrollo de enfermedades como la aterosclerosis o la diabetes tipo II (Sander *et al.*, 2015). Sin embargo, la composición de TAG plasmáticos depende principalmente del consumo lipídico de los últimos días, lo que explicaría la ausencia de diferencias significativas. Aunque la elevada variabilidad en su composición podría aumentar las diferencias intragrupo y dificultar la identificación de TAG como biomarcadores de CVR (Hodson *et al.*, 2008), la ligera disminución de SCTAG en el GE está relacionada con la reducción significativa del contenido del FA C16:0, considerado hipercolesterolémico (Nestel *et al.*, 2014). Además, el elevado contenido plasmático de LCTAG (**Figura 5.2.11**) coincidió con un estudio reciente en el que se

identificaron y cuantificaron las especies de los TAG 50-52CN como las mayoritarias para muestras de plasma humano (Sander *et al.*, 2015). No obstante, el contenido de CN36 aumentó de manera significativa en el GE. Además, tal y como se observa en la **Figura 5.2.13**, la magnitud de este cambio fue grande en nuestra muestra con una *d* de Cohen aproximadamente de 0.5. Esta variación fue consistente con la mayor proporción de MCTAG presente en el QE (Capítulo 4) y, por lo tanto, con una mayor proporción de FA de cadena más larga presentes en el plasma de los voluntarios del GE. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en un estudio reciente en el que se demostró que la suplementación de la dieta de los rumiantes con lino modificó de forma eficaz la composición de los grupos de TAG del QE (Capítulo 4) (Santurino *et al.*, 2017).



**Figura 5.2.11.** Composición de grupos de triglicéridos SCTAG (28-34CN, MCTAG (36-44CN) y LCTAG (46-54CN) de las muestras de plasma de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) al principio (V1) y al final (V5) de la intervención.



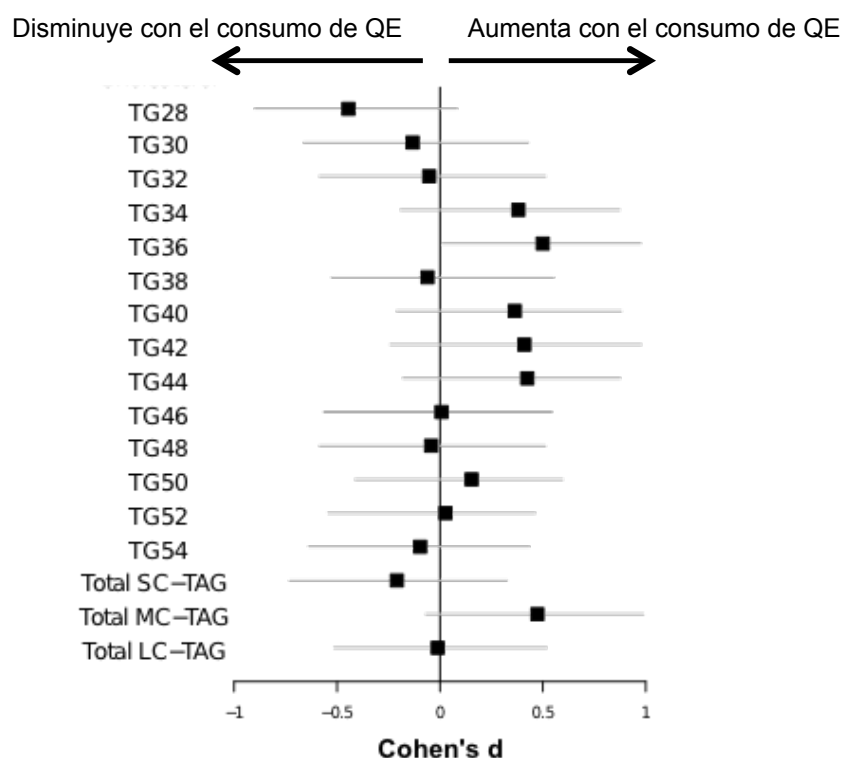
**Figura 5.2.12.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de los grupos de triglicéridos de la fracción lipídica extraída del plasma de un voluntario del ensayo clínico.

**Tabla 5.2.3.** Análisis estadístico de la composición de grupos de triglicéridos del plasma de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) al principio (V1) y al final (V5) del ensayo clínico.

	V1			V5			V5-V1		
	GC	GE	P*	GC	GE		GC	GE	IC95%
% del total de TAG									
TAG28	9.23 ± 13.85	8.83 ± 19.03	0.809	9.24 ± 23.24	8.60 ± 9.68		0 (-4.81;19.96)	-0.25 (-10.81;4.78)	-1.94 (-4.43;0.12)
TAG30	4.55 ± 6.31	4.38 ± 4.75	0.777	4.33 ± 5.74	4.03 ± 4.39		0 (-2.31;4.15)	-0.14 (-3.65;3.78)	-0.22 (-1.08;0.66)
TAG32	3.66 ± 3.14	4.17 ± 3.95	0.172	3.59 ± 3.37	3.89 ± 4.05		-0.05 (-2.33;2.05)	-0.19 (-2.74;3.37)	-0.06 (-0.67;0.62)
TAG34	3.57 ± 2.42	3.61 ± 2.82	0.927	3.52 ± 2.69	3.70 ± 3.84		-0.05 (-1.89;0.94)	0 (-1.82;2.83)	0.33 (-0.13;0.81)
TAG36	2.73 ± 1.50	2.44 ± 2.69	0.623	2.70 ± 2.38	2.85 ± 3.21		-0.03 (-1.88;0.74)	0.07 (-1;2.03)	0.32 (0.03;0.71) #
TAG38	4.68 ± 4.45	4.62 ± 4.48	1.000	4.77 ± 3.47	4.81 ± 3.66		0.03 (-2.21;3.58)	0.11 (-4.38;1.79)	-0.07 (-0.7;0.47)
TAG40	4.79 ± 5.94	4.50 ± 4.89	0.460	4.82 ± 4.73	4.65 ± 4.51		0 (-2.51;3.21)	0.14 (-1.94;2.41)	0.39 (-0.18;0.92)
TAG42	6.99 ± 5.32	6.91 ± 6.97	0.379	6.78 ± 7.74	7.81 ± 4.09		-0.13 (-4.33;4.7)	0.3 (-4.73;3.97)	0.63 (-0.33;1.3)
TAG44	8.67 ± 7.28	8.19 ± 7.23	0.703	8.74 ± 8.54	8.58 ± 8.48		0 (-5.76;2.5)	0.51 (-2.23;6.03)	0.7 (-0.11;1.66)
TAG46	12.43 ± 9.35	11.75 ± 8.37	0.252	13.24 ± 11.86	12.14 ± 11.18		-0.08 (-10.31;5.17)	0 (-7.22;4.56)	0.02 (-1.42;1.42)
TAG48	14.05 ± 7.48	13.11 ± 9.15	0.206	12.97 ± 7.92	12.91 ± 11.90		-0.49 (-5.63;6.64)	-0.01 (-11.45;4.2)	-0.12 (-1.77;1.12)
TAG50	6.53 ± 11.17	6.59 ± 5.33	0.986	6.49 ± 4.98	6.86 ± 7.07		0 (-10.31;2.5)	-0.21 (-2.79;6.74)	0.32 (-0.57;1.59)
TAG52	6.80 ± 7.01	7.37 ± 8.54	0.869	7.48 ± 7.90	7.35 ± 4.70		0.46 (-2.34;3.21)	0.17 (-2.96;5.61)	0.05 (-0.82;0.81)
TAG54	8.93 ± 15.80	9.21 ± 19.69	0.241	8.78 ± 12.78	9.20 ± 17.27		0.6 (-5.73;7.28)	0.25 (-9.37;9.24)	-0.35 (-2.32;1.45)
SCTAG	23.34 ± 21.92	23.18 ± 26.17	0.711	24.19 ± 33.44	23.25 ± 22.01		0 (-13.22;25.92)	-1.06 (-16.26;13.09)	-1.58 (-5.75;2.21)
MCTAG	25.95 ± 23.48	24.32 ± 17.66	0.520	25.57 ± 15.86	26.39 ± 14.02		-0.81 (-12.02;6.06)	0.4 (-7.8;7.65)	1.65 (-0.05;3.47)
LCTAG	49.13 ± 20.96	49.92 ± 28.35	0.922	49.69 ± 37.60	51.40 ± 17.24		0.33 (-13.9;19.26)	-0.04 (-12.58;12.15)	-0.07 (-3.12;3.31)

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p < 0.05$ .

# IC95% significativa de la diferencia de los cambios absolutos entre grupos al finalizar el ensayo clínico.



**Figura 5.2.13.** Magnitud del efecto (*d de Cohen*) del consumo del QE sobre los grupos de TAG en el plasma.

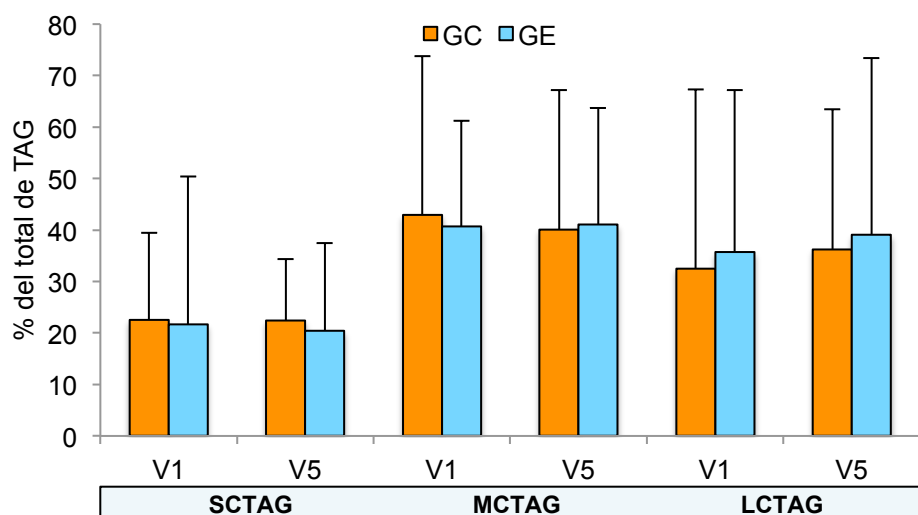
## Eritrocitos

El contenido en TAG de la fracción aislada de eritrocitos sanguíneos de los sujetos estudiados representa una pequeña cantidad del total de grasa, no alcanzando más de un 3-4% del total. La distribución de los grupos de TAG en los eritrocitos del GC y GE fue similar al principio y al final de la intervención. A diferencia del plasma, el contenido máximo se alcanzó en CN46 en ambos grupos. El segundo y el tercer máximo se alcanzaron en CN44 y CN40, respectivamente (**Tabla 5.2.4**). No se encontraron diferencias significativas en la distribución basal media de los grupos de TAG por longitud de cadena (SCTAG, MCTAG y LCTAG) obtenida para el GC (22.5%, 43% y 32.5% respectivamente) en comparación con el GE (21.7%, 40.7% y 35.7% respectivamente) (**Figura 5.2.14**). Al finalizar el estudio, la distribución de TAG se mantuvo estable en el GC. Sin embargo, se observó una leve disminución del contenido de MCTAG (40.1%) como consecuencia del aumento de LCTAG (36.3%), debido fundamentalmente al incremento de CN46 y CN54. Al finalizar el estudio, el perfil de TAG en el GE disminuyó en SCTAG (20.4%), aumentó de MCTAG (41.1%) debido al incremento de CN44, y en LCTAG (39.1%) por el incremento de CN46

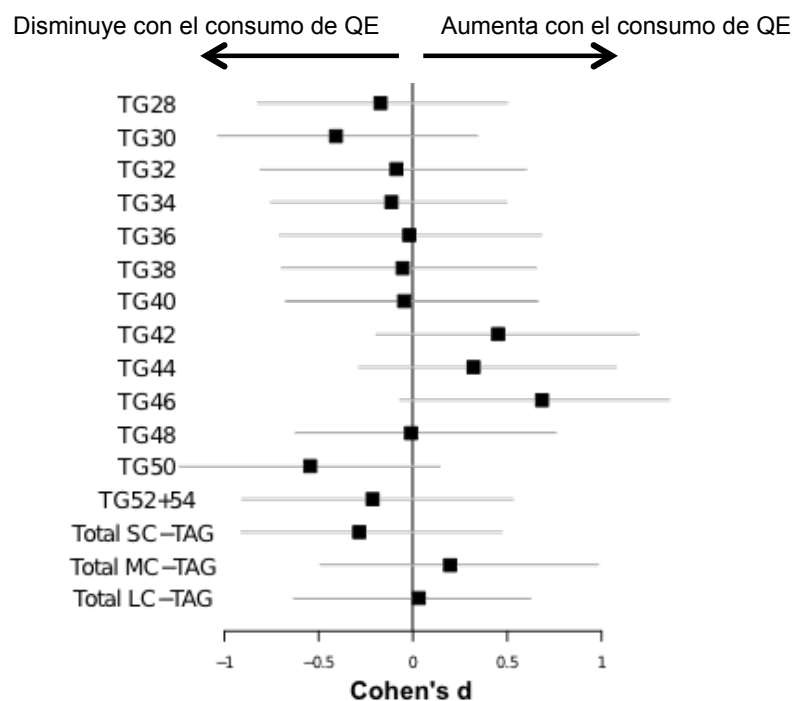
**(Tabla 5.2.4).**

El análisis estadístico de los cambios ocurridos en la composición de TAG en las muestras de eritrocitos entre ambos grupos de intervención a lo largo del ensayo clínico se muestra en la **Tabla 5.2.4**. Se produjo un aumento significativo del grupo CN46 en el GE. La magnitud del aumento de este grupo de TAG fue, además, importante según indica una *d de Cohen* de aproximadamente 0.5, tal y como se observa en la **Figura 5.2.15**. Además, esta variación fue consistente con el aumento de LCTAG en el GE y, a su vez, con la mayor proporción de LCTAG presente en el QE, lo que podría sugerir un cambio en la distribución de TAG en función de los PUFA consumidos en la dieta. No obstante, la ausencia de diferencias significativas en el contenido de TAG coincidió con otros ensayos clínicos descritos anteriormente en los que se evaluó, en sujetos con sobrepeso y el perfil lipídico alterado, el efecto del consumo de FA n3 administrados como aceite de pescado (Murphy *et al.*, 2007), leche enriquecida en PUFA (Venkatraman *et al.*, 2010) y queso enriquecido de manera natural en CLA, TVA y ALA (Pintus *et al.*, 2013). Consecuentemente, tanto la leve disminución de SCTAG, asociada al contenido de SFA, como el incremento de LCTAG observado en ambos grupos, podría estar relacionado con el consumo de una dieta hipocalórica equilibrada rica en PUFA, que justificaría una mejora en el perfil lipídico.

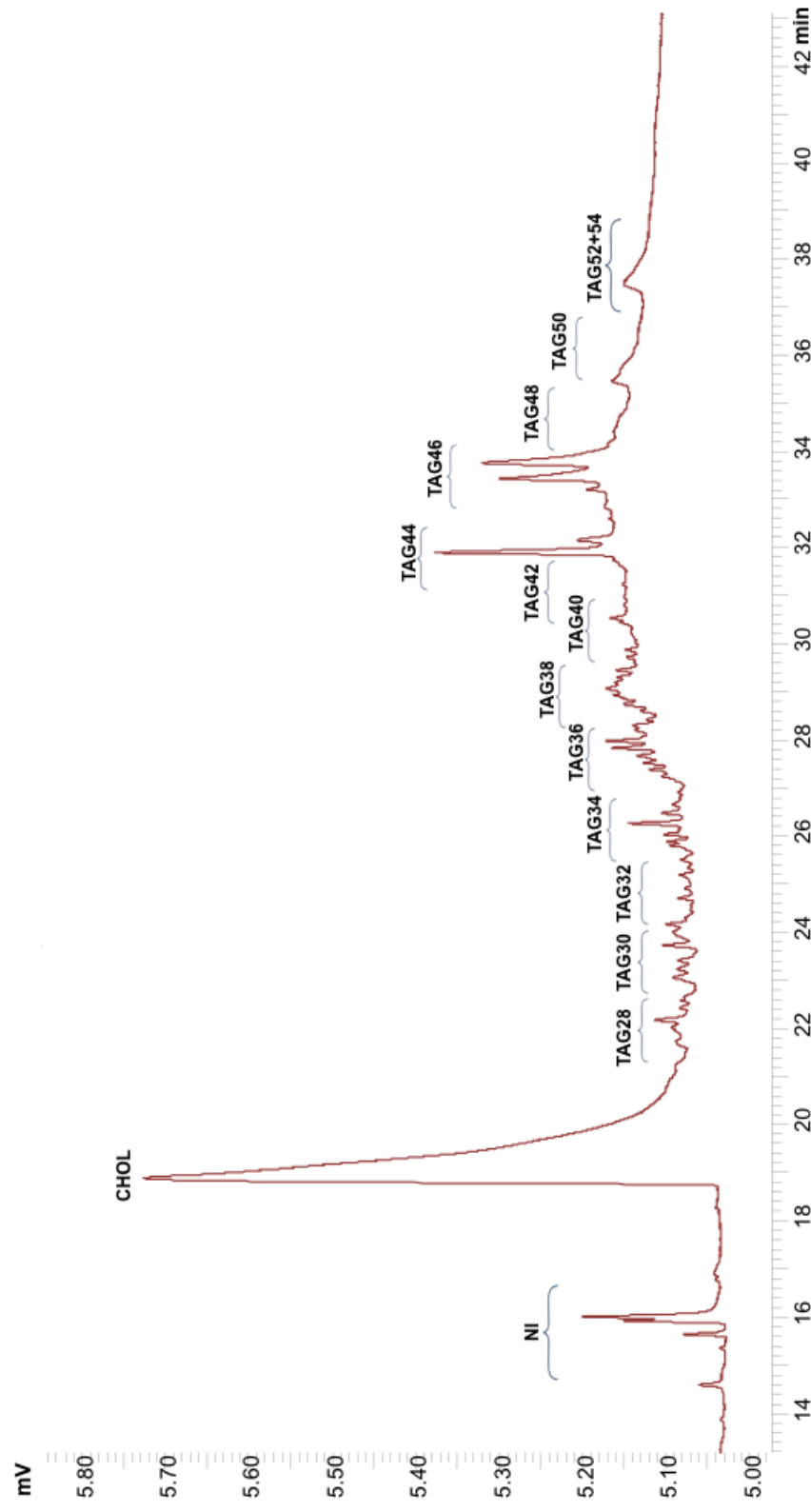
Pese a que la alimentación ha demostrado ejercer un efecto contrastado sobre la composición lipídica del plasma y eritrocitos, la evolución de la distribución de los grupos de TAG en ensayos clínicos de humanos no ha sido estudiada en profundidad previamente. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio constatan que la identificación y cuantificación de los grupos de TAG en función del número de átomos de carbono permite un conocimiento más exhaustivo del efecto del consumo de productos lácteos sobre la composición lipídica sanguínea.



**Figura 5.2.14.** Composición de grupos de triglicéridos SCTAG (28-34CN, MCTAG (36-44CN) y LCTAG (46-54CN) de las muestras de eritrocitos de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) al principio (V1) y al final (V5) de la intervención.



**Figura 5.2.15.** Magnitud del efecto (*d de Cohen*) del consumo del QE sobre los grupos de TAG en los eritrocitos.



**Figura 5.2.16.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de los grupos de triglicéridos de la fracción lipídica extraída de los eritrocitos de un voluntario del ensayo clínico. NI no identificado.



**Tabla 5.2.4.** Análisis estadístico de la composición de grupos de triglicéridos de los eritrocitos de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) al principio (V1) y al final (V5) del ensayo clínico.

% del total de TAG	V1			V5		V5-V1		
	GC	GE	P*	GC	GE	GC	GE	IC95%
TG28	3.86 ± 14.97	3.59 ± 16.82	0.809	3.30 ± 12.42	3.24 ± 6.50	-0.35 (-2.01;5.23)	-0.41 (-4;4.37)	-0.31 (-1.48;0.8)
TG30	3.24 ± 5.58	4.41 ± 11.53	0.777	5.09 ± 6.52	4.19 ± 7.66	0.35 (-4.5;4.47)	-0.38 (-7.7;2.19)	-0.9 (-2.45;0.49)
TG32	5.54 ± 7.00	5.23 ± 8.77	0.172	5.50 ± 5.06	3.89 ± 4.05	0 (-5.98;4.04)	-0.66 (-4.59;3.59)	-0.19(-1.53;1.29)
TG34	3.73 ± 2.89	3.46 ± 4.15	0.927	3.69 ± 3.59	3.33 ± 2.96	-0.47 (-1.97;2.29)	0.06 (-2.7;1.75)	-0.13(-0.87;0.49)
TG36	4.49 ± 5.92	4.25 ± 6.90	0.623	3.85 ± 4.07	3.84 ± 3.23	-0.42 (-3.94;1.06)	-0.97 (-4.73;2.76)	-0.03(-1.03;1.02)
TG38	11.22 ± 14.64	12.09 ± 15.87	1.000	9.88 ± 12.35	10.41 ± 11.78	-1.44 (-11.4;9.02)	-2.17 (-9.9;8.67)	-0.26(-3.16;2.86)
TG40	12.2 ± 16.03	12.31 ± 10.24	0.460	11.05 ± 15.10	10.87 ± 9.34	-1.88 (-9.86;10.67)	-1.34 (-7.15;5.81)	-0.17(-2.62;2.14)
TG42	7.14 ± 5.22	6.13 ± 4.87	0.379	6.25 ± 5.50	6.23 ± 4.86	-0.95 (-4.33;2.29)	0.09 (-3.55;2.7)	0.77 (-0.27;1.98)
TG44	12.52 ± 11.89	11.69 ± 11.92	0.703	12.17 ± 9.92	13.57 ± 5.34	0.62 (-5.22;4.3)	1.06 (-4.31;8)	0.96 (-0.72;3.16)
TG46	13.12 ± 11.06	12.39 ± 10.79	0.252	14.70 ± 12.60	15.62 ± 18.66	0.45 (-5.71;8.7)	3.59 (-5.43;11.91)	2.68 (0.17;5.17) #
TG48	6.63 ± 15.68	5.69 ± 8.29	0.206	6.78 ± 11.93	6.03 ± 9.47	0.21 (-4.33;7.45)	0.59 (-6.78;4.82)	-0.03(-1.93;1.97)
TG50	6.14 ± 7.33	7.52 ± 10.89	0.986	7.03 ± 5.74	6.77 ± 8.47	1.21 (-4.39;5.16)	-0.52 (-7.24;4.3)	-1.42(-3.07;0.26)
TG52+54	7.47 ± 17.63	9.47 ± 16.77	0.241	9.17 ± 11.95	7.74 ± 18.42	1.59 (-5.12;8.89)	0.16(-11.61;11.39)	-0.97(-3.99;2.04)
SCTAG	22.53 ± 16.96	21.73 ± 28.64	0.711	22.46 ± 11.95	20.46 ± 17.01	-0.12 (-9.44;6.67)	-0.59(-16.14;6.02)	-1.61(-5.14;2.02)
MCTAG	42.90 ± 30.86	30.86 ± 20.51	0.520	40.11 ± 41.06	41.06 ± 22.64	-1.86(-16.36;14.33)	0.07 (-15.48;8.98)	1.34(-3.26;5.76)
LCTAG	32.48 ± 34.85	35.71 ± 31.52	0.922	36.27 ± 27.14	39.05 ± 34.39	1.14 (-17.51;22.64)	1.95 (-10;21.79)	0.27(-5.22;5.2)

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t* de Student  $p < 0.05$ .

# IC95% significativa de la diferencia de los cambios absolutos entre grupos al finalizar el ensayo clínico.

### 5.2.3.3. Composición de clases lipídicas en plasma y eritrocitos

Las diferentes clases lipídicas determinadas en el plasma y en los eritrocitos realizan funciones importantes en el organismo humano, implicadas fundamentalmente en la obtención de energía, la inmunidad y el mantenimiento y la señalización de la membrana celular. Además, la presencia de PL en las membranas celulares, justificada por su naturaleza anfifílica, así como el CHOL, hacen posible su mantenimiento. Por lo tanto, el análisis de la evolución de la composición de las diferentes clases lipídicas, tanto del plasma como de los eritrocitos de los voluntarios, resulta esencial para conocer la funcionalidad de las membranas lipídicas y su posible relación con los factores de CVR.

#### Plasma

La clase lipídica más abundante en el plasma de todos los sujetos del ensayo clínico fueron los CE (~47%), seguido de los PL (~25%), los TAG (~20%) y los FFA+CHOL (~10%). En cuanto a la distribución de los diferentes PL, PC fue el mayoritario (~85%), seguido de SM (~12%). El resto de los PL plasmáticos presentaron contenidos bajos. Como se puede observar en la **Tabla 5.2.5**, el contenido basal de las diferentes clases lipídicas fue homogéneo en ambos grupos.

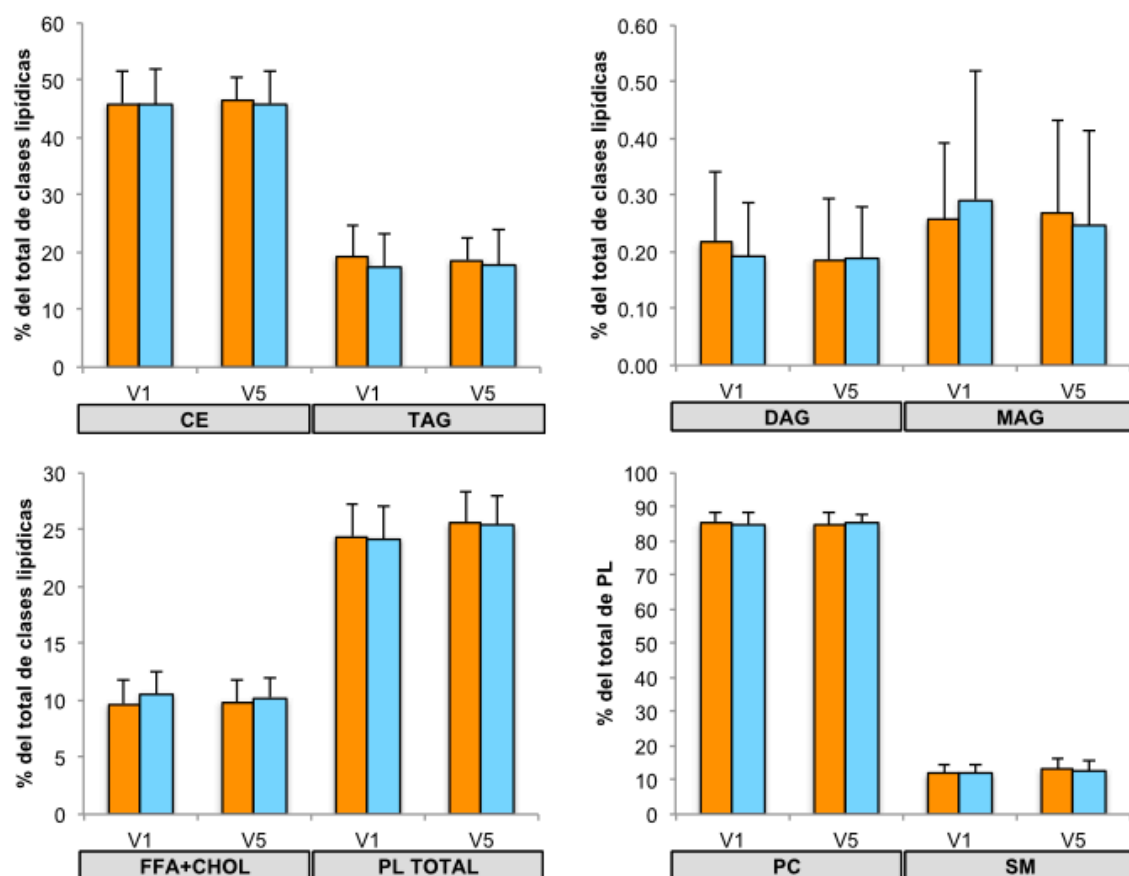
En la **Figura 5.2.17** se puede observar el contenido medio de CE y TAG en el plasma de ambos grupos. Después del consumo del QE, el contenido de CE se mantuvo estable. En una revisión sobre la composición lipídica de la sangre y del tejido adiposo en sujetos sanos, Hodson *et al.* (2008) sugirieron que el contenido plasmático de CE podría alterarse en condiciones patológicas, y que su contenido podría estar influenciado por los FA ingeridos en la dieta. Por ello, la estabilidad de su contenido en el plasma podría ser importante para no aumentar los factores de CVR. Por otro lado, el contenido de TAG no se modificó de manera significativa en función del grupo y del tiempo de tratamiento. Estos resultados coincidieron con los descritos en el Capítulo 5.1, donde el contenido de TAG analizado en el perfil lipídico se mantuvo estable. Igualmente, Skulas-Ray *et al.* (2015) sugirieron, en un ensayo clínico en el que se estudió el efecto de la suplementación dietética con aceite de pescado en 141 sujetos tanto sanos como hipercolesterolémicos, que podría ser necesaria una dosis más elevada de FA n3 para disminuir el contenido de TAG.

De la misma manera, no se observaron diferencias significativas en el contenido de FFA+CHOL en el GE en comparación con el GC (**Figura 5.2.17**). Los FFA provienen de la hidrólisis de los TAG en el tejido adiposo, y circulan en la sangre sin unirse a lipoproteínas. Éstos son utilizados para ser oxidados (obtención de energía) o para la

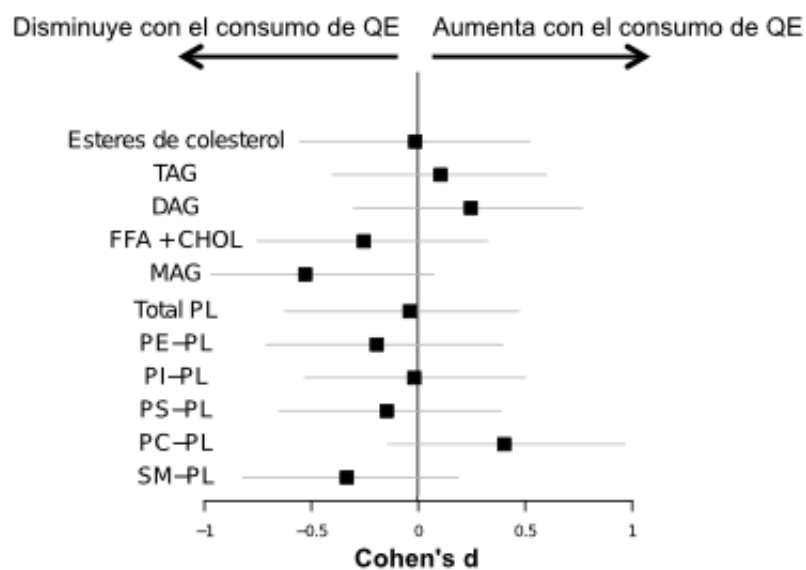
síntesis de nuevos TAG. Por lo tanto, la ausencia de diferencias significativas podría deberse al efecto del consumo de una dieta hipocalórica equilibrada por parte de ambos grupos. Además, como se ha discutido anteriormente, los niveles de FA plasmáticos sólo mostrarían la ingesta lipídica de los últimos días. La ausencia de diferencias significativas en el contenido plasmático de TAG y CHOL coincide con un ensayo clínico reciente de 8 semanas de duración en el que se evaluó, en 159 voluntarios hipercolesterolémicos, el efecto del consumo de 2 yogures de 125 g al día (las primeras 3 semanas) y de 30 gramos de queso Camembert (las últimas 5 semanas) sobre los niveles plasmáticos de TAG y CHOL (Schlienger *et al.*, 2014).

Los PL plasmáticos cuantificados en este estudio constituyen aproximadamente el 25% del total de clases lipídicas, coincidiendo así con los descritos anteriormente para voluntarios sanos por Hodson *et al.*, (2008). Los PL juegan un papel clave en la señalización neuronal y están vinculados a las enfermedades relacionadas con la edad, la coagulación de la sangre, la inmunidad y la respuesta inflamatoria. Como se puede observar en la **Tabla 5.2.5**, el consumo del QE no modificó de manera significativa el contenido plasmático de PL. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el análisis estadístico de la composición de los PL plasmáticos entre ambos grupos al finalizar el período de intervención (**Figura 5.2.17**). La PC, el PL mayoritario, juega un papel esencial en la secreción de VLDL en el hígado, participando en la distribución de CHOL y grasa hacia los tejidos (Castro-Gómez, 2015). En un estudio de cohorte en el que se analizó la composición de clases lipídicas en el plasma en más de 1000 sujetos para investigar los factores de CVR, Weir *et al.* (2013) concluyeron que PC se encuentra altamente expresada en la placa aterosclerótica y contribuye a la mejor absorción de nutrientes liposolubles en la dieta. Consecuentemente, la ausencia de diferencias significativas en el contenido de PC podría ser debida a la disminución de peso corporal en ambos grupos (Capítulo 5.1). Por otro lado, el plasma contiene aproximadamente un 10% de SM del total de PL. Estudios recientes han demostrado la relación existente entre el metabolismo de CHOL y el de SM, e incluso se ha descrito la SM como la responsable de la distribución del CHOL en las células (Castro-Gómez, 2015). Por lo tanto, la estabilidad en la composición de SM y CHOL podría ser debida a la disminución de algunos factores de CVR en ambos grupos (Capítulo 5.1). Por último, el contenido de los PL minoritarios (PE, PI y PS) se mantuvo estable entre grupos al finalizar el ensayo clínico. Los resultados obtenidos coincidieron con un ensayo clínico cruzado de 2 períodos de 3 semanas de duración en el que se estudió la composición y evolución de los diferentes PL plasmáticos en 12 voluntarios con sobrepeso, obesidad y perfil lipídico alterado, después del consumo de leche desnatada, en comparación con la

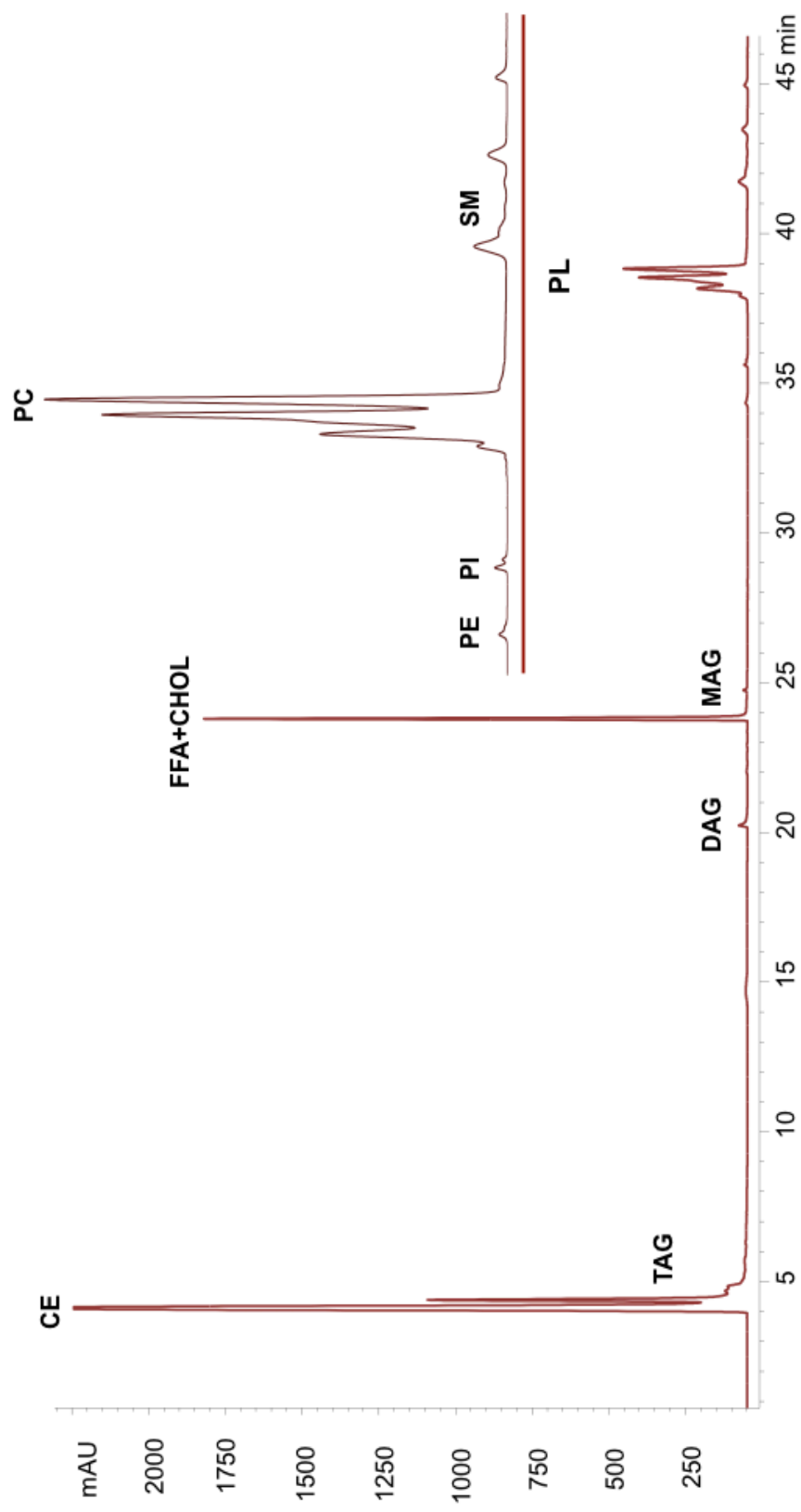
ingesta de productos lácteos elaborados a partir de leche entera (fermentados y no fermentados) (queso Cheddar, yogur, mantequilla y leche) (Nestel *et al.*, 2013).



**Figura 5.2.17.** Composición de las clases lipídicas en el plasma de los voluntarios del GC y GE al principio (V1) y al final (V5) del ensayo clínico.



**Figura 5.2.18.** Magnitud del efecto (*d* de *Cohen*) del consumo del QE sobre la composición lipídica del plasma.



**Figura 5.2.19.** Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-ELSD de los FAME de la fracción lipídica extraída del plasma de un voluntario del ensayo clínico.

**Tabla 5.2.5.** Análisis estadístico de la composición de clases lipídicas del plasma de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) al principio (V1) y al final (V5) del ensayo clínico.

% del total de grasa	V1			V5		V5-V1		
	GC	GE	P*	GC	GE	GC	GE	IC95%
CE	45.99 ± 5.52	45.79 ± 6.21	0.759	46.72 ± 3.85	45.94 ± 5.81	0.97 (-8.55;10.3)	-0.46 (-12.49;9.94)	-0.03 (-2.33;2.34)
TAG	19.37 ± 5.37	17.58 ± 5.83	0.307	18.67 ± 3.72	17.97 ± 5.88	0.44 (-11.85;8.5)	0.92 (-8.39;9.62)	0.54 (-2.93;1.83)
DAG	0.22 ± 0.12	0.19 ± 0.10	0.401	0.19 ± 0.11	0.19 ± 0.09	-0.02 (-0.32;0.31)	0.01 (-0.17;0.12)	0.03 (-0.07;0.03)
MAG	0.26 ± 0.13	0.29 ± 0.23	0.522	0.27 ± 0.17	0.25 ± 0.17	0.01 (-0.2;0.19)	-0.05 (-0.42;0.1)	-0.05 (0;0.1) #
FFA + CHOL	9.72 ± 2.15	10.59 ± 1.92	0.119	9.89 ± 1.95	10.26 ± 1.74	0.15 (-3.05;4.16)	-0.04 (-4.29;2.65)	-0.43 (-0.49;1.35)
PL TOTAL	24.44 ± 2.91	24.26 ± 2.74	0.131	25.55 ± 2.88	25.39 ± 2.66	-0.28 (-2.66;6.4)	-0.32 (-4.89;3.99)	-0.06 (-0.86;1.24)
g/100g PL								
PE	1.19 ± 0.92	0.88 ± 0.52	0.122	1.38 ± 1.14	0.93 ± 0.41	0.08 (-2.03;3.14)	0.13 (-2.38;1.21)	0.13 (-0.22;0.58)
PI	0.61 ± 0.30	0.56 ± 0.33	0.455	0.62 ± 0.30	0.55 ± 0.28	0.03 (-0.44;0.29)	0.01 (-1.09;0.53)	0 (-0.1;0.13)
PS	0.95 ± 1.19	0.55 ± 0.57	0.102	1.02 ± 1.32	0.52 ± 0.37	0.03 (-1.84;2.31)	-0.01 (-1.9;1.03)	-0.08 (-0.17;0.39)
PC	85.35 ± 3.34	84.95 ± 3.44	0.466	84.86 ± 3.36	85.25 ± 2.85	-0.68 (-5.54;4.92)	0.54 (-7.45;8.79)	1.08 (-2.53;0.29)
SM	11.90 ± 2.58	12.03 ± 2.31	0.007	12.15 ± 3.43	12.75 ± 2.89	0.11 (-2.97;6.01)	0.24 (-10.93;5.48)	0.87 (-0.31;2.35)

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p < 0.05$ .

# IC95% significativa de la diferencia de los cambios absolutos entre grupos al finalizar el ensayo clínico.

## Eritrocitos

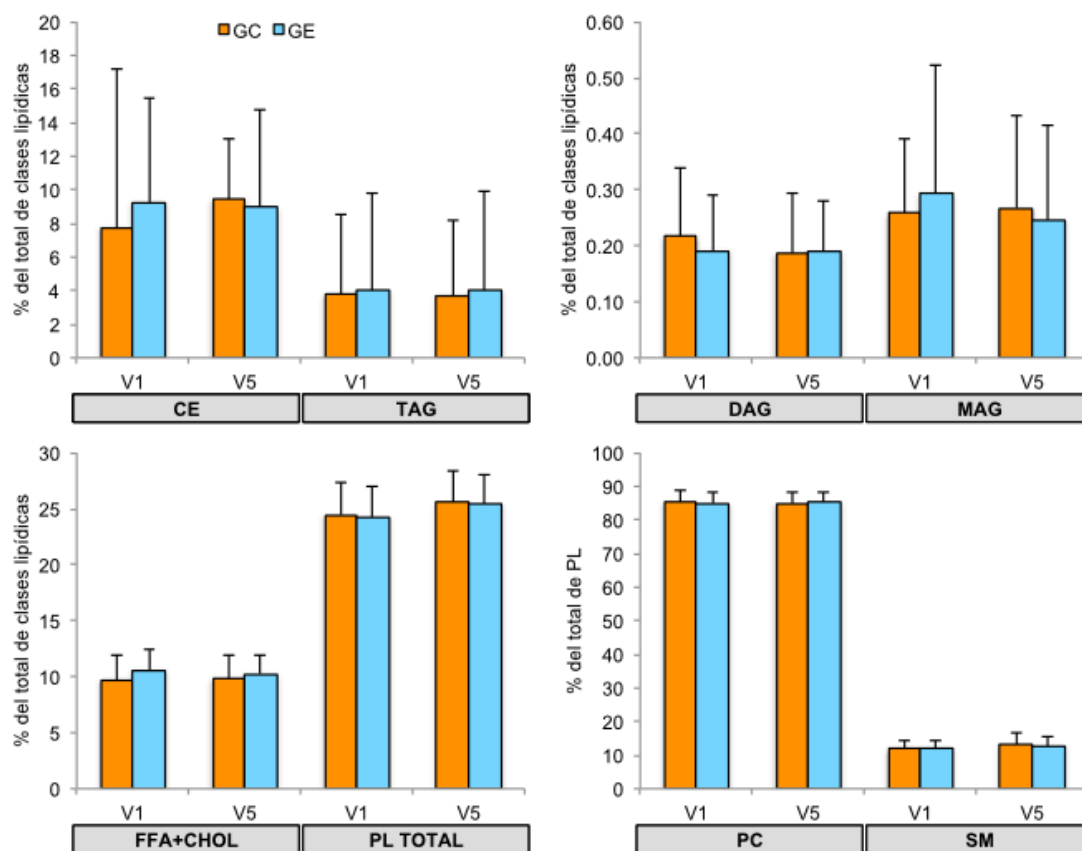
La clase lipídica más abundante en los eritrocitos fue los PL (~50%), seguido de los FFA+CHOL (~35%), CE (~8%) y TAG (~3%) (**Figura 5.2.20**). En cuanto a la distribución de los diferentes PL en los eritrocitos, la PC fue el mayoritario (~45%), seguido de SM (~30%), y PE (~20%). El resto de los PL (PI y PS) se encontraron en pequeñas cantidades. De la misma manera que ocurrió en el plasma, el contenido basal de las diferentes clases lipídicas fue homogéneo para ambos grupos (**Tabla 5.2.6**). Los resultados obtenidos estuvieron en consonancia con los obtenidos por Holcäpek *et al.* (2015) en el estudio descrito anteriormente para muestras de eritrocitos humanos.

El análisis estadístico de los cambios ocurridos en la composición de clases lipídicas en los eritrocitos entre ambos grupos a lo largo del estudio se muestra en la **Tabla 5.2.6**. Al finalizar el ensayo clínico, el consumo del QE no modificó de manera significativa ninguna de las clases lipídicas analizadas. Estos resultados podrían deberse a que los lípidos de los eritrocitos se encuentran principalmente en la membrana. La membrana, altamente elástica, es la responsable del mantenimiento de la forma y de la estabilidad de la célula para proteger y transportar a la hemoglobina, por lo que es importante que su composición se mantenga estable a lo largo del tiempo (Hodson *et al.*, 2008). En general, los eritrocitos mantienen una distribución asimétrica de PL en la membrana: PC y SM, se encuentran en la parte externa de la membrana, mientras que PE, PS y PI se encuentran en la parte interna, siendo esta asimetría un requisito fundamental para la supervivencia de los eritrocitos en el torrente sanguíneo (van Zwieten *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un leve incremento de PC en el GE al finalizar el período de intervención. Aunque la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ), la magnitud del efecto del consumo del QE podría ser relevante en PC, ya que, en nuestro grupo muestral, detectamos una *d de Cohen* elevada (aproximadamente 0.5) para las diferencias en el cambio entre el GE y el GC, tal y como se observa en la **Figura 5.2.21**. En un ensayo clínico reciente de 6 meses de duración, se estudió, en 30 voluntarios con sobrepeso y enfermedad hepática grasa no alcohólica, el efecto combinado del consumo de una dieta Mediterránea y un suplemento rico en vitamina E y PL, especialmente PC. Al finalizar el estudio, se produjo una mejora de algunos factores de CVR y una reducción significativa de la acumulación de grasa intrahepática (Abenavdi *et al.*, 2015). Por lo tanto, la composición de los PL no sólo es el resultado de la ingesta de nutrientes en la dieta, sino también del metabolismo lipídico. Los PL no sólo se mueven de manera dinámica

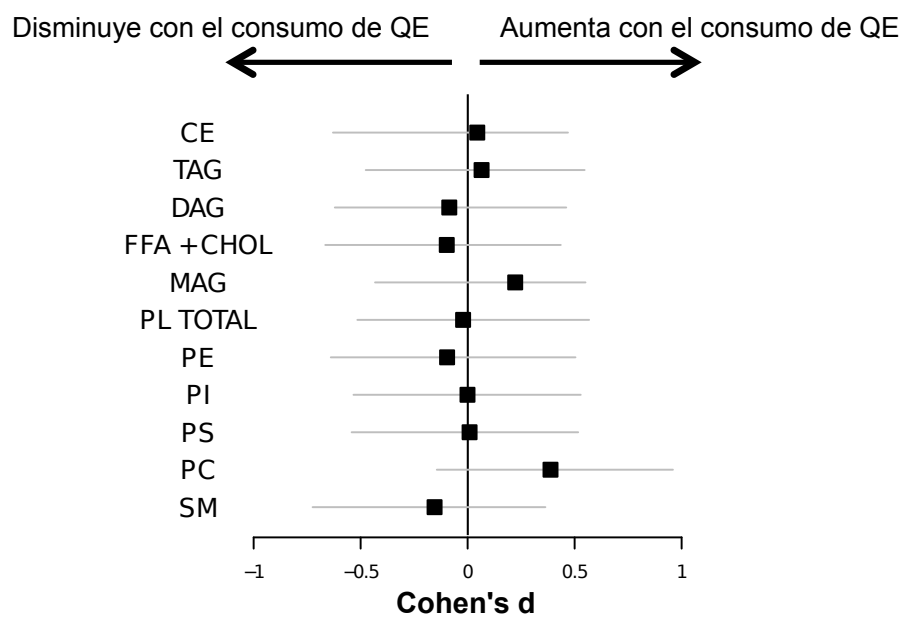


en la parte externa de la bicapa lipídica de los glóbulos rojos, sino que pueden transferirse desde la monocapa externa a la interna y al revés, dependiendo del nivel de insaturación y de las proteínas de la bicapa en la membrana (Weir *et al.*, 2013).

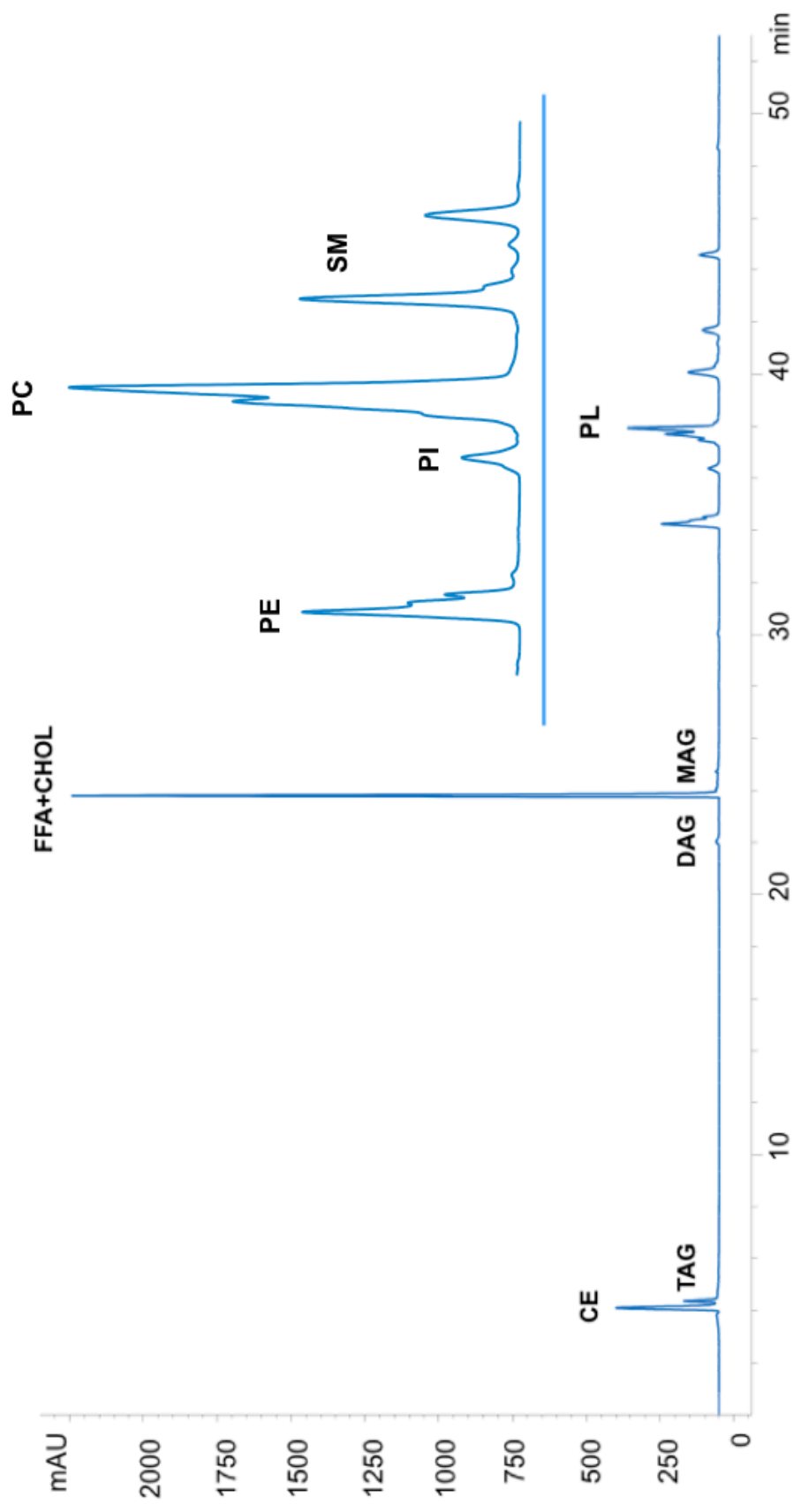
Por lo tanto, las pequeñas variaciones en el contenido de PC y PE en el GE podrían también ser debidas tanto a la degradación y renovación constante de PL en la membrana de los eritrocitos. Como es bien sabido, el metabolismo lipídico desempeña un papel fundamental en la evolución de las CVD (Weir *et al.*, 2013), por lo que el tiempo de intervención podría ser, una vez más, un factor clave en la obtención de resultados consistentes en los ensayos clínicos de suplementación en humanos.



**Figura 5.2.20.** Composición de las clases lipídicas en los eritrocitos de los voluntarios del GC y GE al principio (V1) y al final (V5) del ensayo clínico.



**Figura 5.2.21.** Magnitud del efecto (*d de Cohen*) del consumo del QE sobre la composición lipídica de los eritrocitos.



**Figura 5.2.21.** Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-ELSD de los FAME de la fracción lipídica extraída de los eritrocitos de un voluntario del ensayo clínico.

**Tabla 5.2.6.** Análisis estadístico de la composición de clases lipídicas de los eritrocitos de los voluntarios del ensayo clínico (GC y GE) al principio (V1) y al final (V5) del ensayo clínico.

% del total de TAG	V1			V5		V5-V1			IC95%
	GC	GE	P*	GC	GE	GC	GE		
CE	7.74 ± 9.44	9.26 ± 10.49	0.527	9.45 ± 3.59	8.97 ± 5.10	3.01 (-49.28;19.02)	2.91 (-45.14;17.4)	0.56 (-7.36;6.6)	
TAG	3.78 ± 4.80	3.98 ± 1.62	0.682	3.73 ± 4.41	3.99 ± 2.63	0.49 (-21.34;12.42)	0.96 (-24.58;4.72)	0.36 (-2.82;3.16)	
DAG	0.56 ± 0.42	0.48 ± 0.25	0.528	0.49 ± 0.38	0.46 ± 0.34	-0.02 (-1.52;1.7)	0.03 (-1.48;0.7)	-0.04 (-0.34;0.2)	
MAG	0.49 ± 0.44	0.43 ± 0.24	0.317	2.12 ± 0.87	1.43 ± 0.47	-0.01 (-21.68;2.55)	-0.02 (-1.86;1.04)	0.65 (-0.22;3.51)	
FFA + CHOL	36.78 ± 10.02	36.83 ± 6.88	0.499	35.59 ± 12.25	35.28 ± 6.73	-0.89 (-27.56;36.17)	-2.91 (-26.59;30.57)	-1.21 (-8.4;7.4)	
PL TOTAL	49.47 ± 11.61	48.82 ± 6.40	0.517	48.74 ± 10.12	48.36 ± 7.11	-1.91 (-24.36;53.2)	-1.25 (-20.96;40.51)	-0.31 (-7.26;7)	
g/100g PL									
PE	19.64 ± 6.19	18.70 ± 5.50	0.841	19.31 ± 6.03	18.89 ± 6.02	-0.7 (-19.53;14.35)	-1.44 (-18.43;15.69)	-0.72 (-4.56;3.37)	
PI	0.86 ± 0.52	0.75 ± 0.31	0.384	0.76 ± 0.25	0.75 ± 0.44	-0.07 (-0.8;1.19)	-0.06 (-1.02;0.55)	0 (-0.22;0.17)	
PS	3.65 ± 1.60	3.42 ± 0.91	0.885	3.71 ± 1.60	3.71 ± 1.28	-0.13 (-5.48;4.69)	0.16 (-2.8;2.05)	0.01 (-0.76;0.74)	
PC	44.19 ± 3.88	46.91 ± 3.86	0.488	44.90 ± 3.86	45.91 ± 4.60	0.95 (-12.41;12.18)	3.02 (-3.92;11.77)	1.83 (-0.57;4.37)	
SM	31.67 ± 6.06	30.22 ± 5.46	0.819	31.32 ± 5.59	30.74 ± 5.88	-0.37 (-17.08;22.56)	-0.44 (-19.63;12.04)	-1.13 (-5.46;2.32)	

\*Diferencias basales significativas entre los dos grupos de intervención según la prueba *t de Student*  $p < 0.05$ .

# IC95% significativa de la diferencia de los cambios absolutos entre grupos al finalizar el ensayo clínico.

#### 5.2.4. CONCLUSIONES PARCIALES

El análisis de biomarcadores lipídicos en las muestras de plasma y eritrocitos de los voluntarios del ensayo clínico permitió determinar, de manera muy exhaustiva, la variación en la composición de FA, así como de los diferentes grupos de TAG y de clases lipídicas.

El consumo de QE disminuyó de manera significativa el contenido plasmático de ácido palmítico (C16:0), relacionado con la hipercolesterolemia, a su vez que aumentó el contenido de PUFA, debido al aumento significativo de LA, con reconocidos efectos beneficiosos sobre la salud. Por otro lado, la determinación de los grupos de TAG en plasma y eritrocitos, no estudiada previamente en ensayos clínicos en humanos en profundidad, permitió observar un incremento en el contenido plasmático de MCTAG, debido al aumento significativo de CN36 en el grupo que consumió el QE.

Asimismo, se produjo un aumento del contenido de LCTAG en los eritrocitos, debido principalmente al aumento significativo de CN46 en el GE, correspondiéndose con un aumento del contenido de FA de cadena más larga y coincidiendo con el aumento de LCTAG en el QE comprobado en el Capítulo 4, lo que sugiere un cambio en la distribución de TAG en función de los PUFA consumidos en la dieta. Por otro lado, los cambios ocurridos en los niveles de las diferentes clases lipídicas en plasma y eritrocitos en función de los nutrientes consumidos en la dieta mostraron un aumento relevante en el contenido de PC en los eritrocitos de los voluntarios que consumieron el QE.

Por lo tanto, el análisis de la composición lipídica del plasma y eritrocitos ha permitido obtener una información importante para determinar las ventajas del consumo del queso enriquecido en FA n3 y CLA. Este estudio ha proporcionado un conocimiento íntegro del efecto del consumo de productos lácteos enriquecidos sobre la composición lipídica sanguínea. No obstante, el estudio del tiempo de intervención de los ensayos clínicos, así como la dosis de los compuestos bioactivos y la estandarización en la medición de biomarcadores lipídicos, será necesaria en futuros estudios para facilitar su análisis y poder utilizar estas herramientas como indicadores en la prevención clínica de CVD.

## 6. RESUMEN

La leche está compuesta mayoritariamente por agua, carbohidratos, grasa, proteínas, vitaminas y minerales, manteniendo un buen balance entre sus componentes. Tanto la leche como otros productos lácteos son consumidos como parte de una dieta equilibrada gracias a su alto aporte nutricional. Más específicamente, los lípidos lácteos constituyen uno de los elementos más importantes de la leche y de los productos lácteos por las características organolépticas y físicas que les confiere. Aunque algunos autores señalan que la grasa láctea puede ser considerada una fuente innecesaria de calorías en la dieta, revisiones y metaanálisis recientes han concluido que no existe una asociación directa entre la ingesta de leche y productos lácteos enteros y el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. La grasa láctea es la fuente de lípidos más compleja de la dieta humana y está compuesta por más de 400 ácidos grasos (FA), de los cuales aproximadamente un 60-70% son ácidos grasos saturados (SFA), un 20-25% son ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), un 1-4% son ácidos grasos *trans* (TFA), y un 2-5% son ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Además, en su composición se hallan presentes compuestos con una importante actividad biológica en su composición, como el ácido butírico (C4:0) y el ácido linoleico conjugado (CLA), y otros como los FA omega-6 (n6) y omega-3 (n3) y los fosfo- y esfingolípidos que han demostrado contribuir al mantenimiento de la salud y a la prevención de enfermedades crónicas en humanos.

Gracias a sus propiedades intrínsecas, la leche de cabra forma parte de la tendencia actual existente en los países desarrollados por una alimentación saludable. La presencia de compuestos biológicamente activos, el contenido de proteínas de alta calidad y el pequeño tamaño de los glóbulos de la grasa de la leche, le confieren una mejor digestibilidad, absorción y textura, haciéndola más atractiva desde el punto de vista de la salud. Además, la mayor presencia en la fracción lipídica de la leche de cabra de ácido linoleico (LA) y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido ruménico (el principal isómero del ácido linoleico conjugado), ácido vacénico (TVA) y esfingomielina, con potenciales efectos cardioprotectores, la convierte en una alternativa interesante para el desarrollo de productos lácteos con alto valor añadido como el queso.

Por otro lado, las enfermedades cardiovasculares (CVD) son la principal causa de muerte en los países desarrollados, y en España representan aproximadamente el 30% del total de fallecimientos, por encima del cáncer y de las enfermedades del sistema respiratorio. La alta incidencia de estas enfermedades es debida principalmente a los factores de riesgo modificables, entre los que se destacan la hipertensión arterial, la falta de actividad física, el consumo de una dieta no equilibrada, la dislipemia y el sobrepeso y la obesidad, entre otros. Por lo tanto, el

tratamiento de las CVD se basa fundamentalmente en el control de la calidad y de la cantidad de grasa presente en la dieta, en la reducción del consumo de sal, y en los controles clínicos, así como en evitar el sedentarismo, no sólo para paliar los sucesos cardiovasculares, prevenir su aparición y sus posibles complicaciones, sino para reducir el uso de fármacos y evitar sus posibles efectos secundarios.

En las últimas décadas, el estudio de los efectos beneficiosos de los alimentos funcionales a través de la incorporación de ingredientes con actividad biológica está estrechamente relacionado con el mantenimiento y la promoción de la salud, la mejora del bienestar general y la reducción del riesgo de padecer enfermedades, entre ellas las CVD. Entre las distintas estrategias utilizadas, la modificación de la dieta de los rumiantes se ha convertido en una forma natural y económica de mejorar la composición de los FA de la leche. Más específicamente, la suplementación con lípidos de origen vegetal como las semillas de lino, consideradas una fuente importante de FA n3, han demostrado ser un sustrato idóneo para llevar a cabo la suplementación de la dieta de las cabras, puesto que permite aumentar el contenido de ALA, ácido ruménico y TVA en la leche de cabra, y disminuir simultáneamente los niveles de los SFA asociados a los factores de riesgo cardiovascular, sin que se vean afectados los demás componentes ni las características organolépticas de la leche y los productos lácteos.

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente descritos, la presente Tesis Doctoral tiene como **objetivo general**: la evaluación del efecto de la ingesta de un queso enriquecido de manera natural en FA n3 y CLA mediante un ensayo clínico de intervención nutricional en voluntarios con sobrepeso, obesidad y el perfil lipídico alterado (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, etc.).

Para la consecución de dicho objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

1. Obtención de una leche de cabra con el perfil lipídico mejorado de manera natural mediante la reducción del contenido en SFA y el aumento de PUFA n3 y CLA.
2. Caracterización físico-química, lipídica, organoléptica y nutricional de un queso de cabra enriquecido, elaborado industrialmente a partir de la leche seleccionada.
3. Evaluación del efecto de la ingesta del queso enriquecido en lípidos saludables en voluntarios con sobrepeso y obesidad mediante un ensayo clínico de intervención nutricional, prospectivo, aleatorizado, paralelo, doble ciego y controlado.



3.1. Estudio antropométrico y determinación de marcadores sanguíneos de riesgo cardiovascular, de inflamación y de saciedad.

3.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de los biomarcadores lipídicos de riesgo cardiovascular en plasma y en eritrocitos.

Para alcanzar estos objetivos, se llevó a cabo el análisis de la leche procedente de 5 explotaciones de cabras de raza Murciano-Granadina, con el objetivo de seleccionar aquel rebaño que produjera leche con unas características más saludables en su fracción lipídica para participar en el estudio de suplementación posterior. La estrategia utilizada consistió en el ensayo de una formulación de pienso incorporando dos dosis de semillas de lino como suplemento lipídico Lodyn Milk® en su composición: 18.5% y 25% del total del concentrado. La dosis de 18.5% de suplemento permitió obtener una leche de cabra enriquecida en compuestos bioactivos como FA n3 y CLA, sin producir problemas de ingesta ni alteraciones en el rumen de las cabras.

Con los resultados obtenidos, se llevó a cabo la elaboración de un queso tierno de pasta prensada a escala industrial a partir de la leche enriquecida (queso enriquecido), que se comparó con el queso comercial (queso control). Posteriormente, se realizó la caracterización físico-química, lipídica y organoléptica de los quesos de ambos lotes, realizando un análisis exhaustivo de los cambios ocurridos en la fracción de lípidos tanto neutros como polares (fosfo- y esfingolípidos). Además, se efectuó un análisis de textura y una evaluación sensorial de los mismos, y se comprobó el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre su composición lipídica. Tal y como se esperaba, la suplementación de la dieta de las cabras redujo de manera significativa el contenido de los SFA mayoritarios (C14:0 y C16:0). Asimismo, el contenido de PUFA aumentó significativamente por la suplementación en el queso enriquecido, más específicamente el contenido de compuestos bioactivos como ALA, cuyo contenido fue cinco veces superior, y CLA y TVA, que alcanzaron el doble de su concentración inicial. Por otro lado, el incremento de la presencia de triglicéridos con un elevado número de átomos de carbono (TAG de cadena larga) en el queso enriquecido, fue consistente con la mayor proporción de PUFA presente en su composición. Además, la concentración de estos FA potencialmente saludables en el queso enriquecido se mantuvo estable a lo largo de 12 meses de almacenamiento en las dos temperaturas estudiadas de refrigeración y congelación. Otros efectos destacables son una reducción significativa del contenido de colesterol, lo que se asocia con una disminución del riesgo cardiovascular, y un aumento del contenido de esfingomielina

en el queso enriquecido, lo que se relaciona con potenciales beneficios en la salud gastrointestinal y en la actividad cognitiva. Por otra parte, aunque la aceptabilidad general fue menor en el queso enriquecido, cabe señalar que en la prueba triangular los panelistas no fueron capaces de diferenciar entre ambos quesos. Estos resultados permiten considerar que la estrategia de la suplementación de la dieta de las cabras empleada en este estudio podría adoptarse de manera rutinaria para lograr un nivel constante de enriquecimiento de forma natural de la grasa láctea en FA n3 y CLA.

Debido a la notable influencia que ejercen la alimentación y el estilo de vida sobre los factores de riesgo de las CVD, las recomendaciones nutricionales y el ejercicio físico regular resultan claves para su prevención y tratamiento. Actualmente, las recomendaciones nutricionales se orientan principalmente hacia el control de la cantidad y la calidad de la grasa de la dieta, así como a la reducción de los niveles de colesterol y del contenido de sodio. En la actualidad, los estudios clínicos recientes no han logrado poner de manifiesto evidencias suficientes que relacionen el consumo de productos lácteos enteros con una mayor incidencia de CVD. Sin embargo, es necesario llevar a cabo una investigación más exhaustiva para poder obtener resultados suficientemente consistentes en humanos. Por todo lo anterior, se llevó a cabo un ensayo clínico de intervención nutricional, aleatorizado, paralelo, doble ciego y controlado de 12 semanas de duración en 68 voluntarios con sobrepeso, obesidad y el perfil lipídico alterado. El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto del consumo de 60 g/día del queso enriquecido de manera natural en FA n3 y CLA (grupo experimental), en comparación con el consumo de queso control (grupo control), sobre la composición corporal y los marcadores sanguíneos lipídicos, de inflamación y de saciedad. Los resultados de este estudio han demostrado que el consumo de queso de cabra en ambos grupos de intervención, en el contexto de una dieta hipocalórica equilibrada y con recomendaciones para la realización de 30 minutos de actividad física diaria, es efectivo en la reducción de parámetros antropométricos como el peso corporal, la masa grasa total, la circunferencia de cintura y la frecuencia cardíaca. En cuanto a los niveles de los marcadores analizados, se deduce que el consumo de queso, tanto en el grupo control como en el grupo experimental, no afectó de manera significativa a los niveles sanguíneos de LDL y TAG, considerados marcadores de riesgo aterogénico, durante todo el período de tratamiento. De la misma manera, la concentración sanguínea de las apolipoproteínas ApoA1 y ApoB se mantuvo dentro de los valores normales de referencia para la población estudiada en ambos grupos de estudio. El consumo de queso no modificó los niveles de los marcadores hormonales sanguíneos de saciedad (grelina y leptina) y del metabolismo óseo (calcio y fósforo) en ninguno de los grupos de intervención. No obstante, se produjo un ligero, pero

positivo, aumento de los niveles sanguíneos de vitamina D en ambos grupos al finalizar el estudio. Por otro lado, el consumo del queso enriquecido aumentó de manera significativa el nivel de HDL, considerado un marcador cardioprotector, en el grupo experimental al finalizar la intervención. Respecto a los marcadores sanguíneos de inflamación, el consumo regular de queso, tanto en el grupo control como en el grupo experimental, mantuvo estables los valores de las citoquinas proinflamatorias: TNF- $\alpha$  e IL-6, así como de los marcadores de estrés oxidativo: LDL-ox y fibrinógeno y de FA libres a lo largo de todo el período de intervención. En contraste, la concentración plasmática de la Proteína C Reactiva, considerada un importante marcador del estado inflamatorio en personas con sobrepeso, obesidad y el perfil lipídico alterado, disminuyó de manera significativa en el grupo experimental al finalizar el estudio.

De acuerdo a la bibliografía, está bien establecido que los lípidos sanguíneos pueden ser utilizados como biomarcadores del consumo de la grasa de la dieta. Mientras que los niveles de los FA plasmáticos son indicadores de la ingesta en un período relativamente corto de tiempo (días), los niveles de FA de los eritrocitos reflejan el consumo de alimentos durante semanas, siendo considerados marcadores a largo plazo. Además, en cada una de las fracciones sanguíneas (plasma y eritrocitos), la distribución y el contenido de los diferentes biomarcadores lipídicos es el resultado tanto de la ingesta de grasa, como de su absorción y metabolismo.

Dentro de este contexto, se estudió la influencia del consumo del queso enriquecido mediante el análisis, la identificación y la evolución del contenido de los biomarcadores lipídicos en los voluntarios del ensayo clínico. Para ello, la fracción lipídica de las muestras de sangre (plasma y eritrocitos) al inicio y al final del período de intervención, se sometió a un exhaustivo análisis cromatográfico. Los resultados del análisis de la composición en FA mostraron una disminución significativa del contenido plasmático tanto de ácido palmítico (C16:0), un FA relacionado con la hipercolesterolemia, como de ácido oleico (*cis*-9 C18:1) en el grupo experimental. Además, otro aspecto positivo encontrado, fue el aumento significativo del contenido plasmático de PUFA que se observó al finalizar la intervención en el grupo que consumió el queso enriquecido. Por otra parte, la distribución de las especies moleculares de TAG en plasma y eritrocitos, escasamente estudiada en profundidad en otros ensayos clínicos, mostró una ligera disminución en el contenido de los TAG de cadena corta en el grupo experimental, relacionada con la reducción significativa de SFA. Por otro lado, el estudio de la composición de clases lipídicas resulta esencial para conocer la funcionalidad de las membranas lipídicas y su posible relación con los factores de riesgo cardiovascular. En cuanto al contenido de lípidos polares de la fracción de los eritrocitos, se observó

un leve incremento de la fosfatidilcolina en el grupo experimental, considerada importante por su papel en la absorción de los nutrientes liposolubles de la dieta. Dicho aumento podría ser el resultado tanto del metabolismo lipídico como de la degradación y renovación constante de los lípidos polares en las membranas de los eritrocitos.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el consumo de queso enriquecido produce una variación de los marcadores lipídicos y de inflamación, lo que se relaciona con una disminución de los factores de riesgo cardiovascular. Estos resultados contribuyen a un mayor conocimiento de los biomarcadores sanguíneos relacionados con el consumo de queso. Sin embargo, sería necesario realizar más ensayos clínicos de suplementación con productos lácteos enriquecidos en PUFA n3 en sujetos con sobrepeso y obesidad para evaluar el tamaño muestral y el tiempo de intervención óptimos y estandarizar los biomarcadores lipídicos para poder utilizarlos como indicadores en la prevención clínica de enfermedades cardiovasculares.

## 7. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han permitido extraer las siguientes conclusiones:

**Relativas a:**

**A. Desarrollo de un queso de cabra enriquecido de manera natural en omega-3 y ácido linoleico conjugado.**

1. La incorporación de un suplemento lipídico basado en semilla de lino extrusionada en el pienso de las cabras, permite obtener de forma natural una leche con el perfil lipídico nutricionalmente mejorado, con un menor contenido en ácidos grasos saturados y enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en compuestos bioactivos como el ácido  $\alpha$ -linolénico, cuyo contenido es cinco veces superior, y el ácido linoleico conjugado y el ácido vacénico, que alcanzan el doble de su concentración inicial.
2. El proceso de transformación de leche a queso no produjo cambios en la fracción lipídica ni en la concentración de ácidos grasos bioactivos, que se mantuvieron estables durante el almacenamiento del mismo a temperaturas de refrigeración y congelación.
3. El queso enriquecido de manera natural presenta una reducción significativa del contenido total de ácidos grasos saturados, en particular de ácido mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), así como una reducción de colesterol, compuestos que, en el caso de un consumo elevado, se asocian con situaciones de hipercolesterolemia y elevado riesgo cardiovascular. Igualmente, el aumento significativo de la concentración de esfingomielina, tanto en la leche como en el queso enriquecido, se considera relevante, por su potencial contribución en la salud gastrointestinal y en la actividad cognitiva.

**B. Ensayo clínico en voluntarios con sobrepeso y obesidad.**

4. El consumo de 60 g/día de queso durante 12 semanas, en el contexto de una dieta hipocalórica, equilibrada y con recomendación de actividad física moderada, produce una disminución del peso corporal, de la masa grasa total, de la circunferencia de cintura y de la frecuencia cardíaca, tanto en los voluntarios del grupo control como en los del grupo experimental, con la consecuente reducción de los marcadores de riesgo cardiovascular y metabólico.

5. El consumo de queso no modifica el contenido sanguíneo de LDL y triglicéridos, marcadores de riesgo aterogénico, ni en los voluntarios del grupo control ni en los del grupo experimental.
6. En los voluntarios del grupo experimental, tras consumir 60 g/día de queso enriquecido durante 12 semanas, se produce una reducción del riesgo aterogénico, detectado mediante un incremento significativo en el nivel de las lipoproteínas HDL plasmáticas denominadas “cardioprotectoras”, ya que retiran el colesterol presente en sangre. Igualmente, en estos voluntarios se reduce significativamente el contenido de la Proteína C Reactiva, un marcador de inflamación en personas con sobrepeso, obesidad y el perfil lipídico alterado.
7. El consumo de queso, tanto en los voluntarios del grupo control como del grupo experimental, no modifica los marcadores hormonales sanguíneos de saciedad - grelina y leptina-, y del metabolismo óseo -calcio y fósforo-, aunque provoca un ligero aumento de la presencia de vitamina D
8. Los voluntarios del grupo experimental, tras consumir 60 g/día de queso enriquecido durante 12 semanas, presentan un perfil lipídico plasmático más saludable, que se refleja en la disminución significativa del contenido en ácido palmítico (C16:0), un ácido graso saturado asociado a la hipercolesterolemia, y en un aumento significativo en ácidos grasos poliinsaturados, empleados como biomarcadores de salud cardiovascular.
9. El aumento del contenido de los triglicéridos de cadena media y larga en los eritrocitos de los voluntarios del grupo experimental se relaciona con una mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados en el queso enriquecido, por lo que la determinación de las especies moleculares de los triglicéridos se considera un buen marcador de la composición grasa de la dieta.
10. El análisis exhaustivo mediante técnicas cromatográficas de alta resolución de la composición en ácidos grasos, triglicéridos y clases lipídicas en las muestras sanguíneas de los voluntarios, proporciona una visión integral de su estado postprandial, por lo que puede implementarse como una herramienta eficaz para la determinación de biomarcadores lipídicos en la prevención clínica de enfermedades cardiovasculares.

## 8. BIBLIOGRAFÍA



Abdullah, M. M., Cyr, A., Lepine, M. C., Labonte, M. E., Couture, P., & Jones, P. J. (2015). Recommended dairy product intake modulates circulating fatty acid profile in healthy adults: a multi-centre cross-over study. *The British Journal of Nutrition*, 113(3):435-44.

Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación de la materia insaponificable. Método por extracción con éter dietílico. (2002). UNE-EN ISO 3596:2002.

Aguilera, R., Jorquera, P. J., Salgado, C. J., & Flores, C. (2016). Efectividad de la suplementación de calcio en el índice de masa corporal en personas obesas: un overview de revisiones sistemáticas. *Nutricion Hospitalaria*, 33, 978-982.

Ainsworth, B. E., Haskell, W. L., Whitt, M. C., Irwin, M. L., Swartz, A. M., Strath, S. J., & Leon, A. S. (2000). Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 32(9 Suppl), S498-504.

Albenzio, M., Santillo, A., Avondo, M., Nudda, A., Chessa, S., Pirisi, A., & Banni, S. (2016). Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health. *Small Ruminant Research*. 135:3–12.

Alexander, D. D., Bylsma, L. C., Vargas, A. J., Cohen, S. S., Doucette, A., Mohamed, M., & Fryzek, J. P. (2016). Dairy consumption and CVD: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, 115(4), 737-750.

Ali, K. M., Wonnerth, A., Huber, K., & Wojta, J. (2012). Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol – current therapies and future opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1177–1194.

Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J., & Juárez, M. (1999). Fatty Acid Composition of Caprine Milk: Major, Branched-Chain, and Trans Fatty Acids. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 878-884.

Altenhofer, C., Spornraft, M., Kienberger, H., Rychlik, M., Herrmann, J., Meyer, H. H., & Viturro, E. (2014). Effects of rapeseed and soybean oil dietary supplementation on bovine fat metabolism, fatty acid composition and cholesterol levels in milk. *Journal of Dairy Research*, 81(1), 120-128.

Amills, M. (2014). The Application of Genomic Technologies to Investigate the Inheritance of Economically Important Traits in Goats. *Advances in Biology*, 13.

- Andic, S., Tunc Turk, Y., & Javidipour, I. (2011). Effects of frozen storage and vacuum packaging on free fatty acid and volatile composition of Turkish Motal cheese. *Food Science and Technology International*, 17(4), 375-394.
- Annunziata A., Pascale, P. (2009) "Consumers' behaviours and attitudes toward healthy food products: the case of organic and functional foods" Proceedings of the 113th EAAE Seminar – A Resilient European Food Industry and Food Chain in a Challenging World. Chania, Crete, Greece.
- Annunziata, A., & Vecchio, R. (2011). Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3(3), 223-228.
- Aranceta, J., Arija, V. V., Maiz, E., Martinez, E., Ortega, R. M., Perez-Rodrigo, C., & Serra, L. (2016). Dietary Guidelines for the Spanish population (SENC, diciembre 2016); the new graphic icon of healthy food. *Nutrición Hospitalaria*, 33(Suppl 8), 1-48.
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83 (6 Suppl):1467s-76s.
- Astrup, A., Rice, B. H., Brenna, J. T., Delplanque, B., Ferry, M., & Torres-Gonzalez, M. (2016). Regular-Fat Dairy and Human Health: A Synopsis of Symposia Presented in Europe and North America (2014-2015). *Nutrients*, 8(8).
- Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F. B., Jakobsen, M. U., & Willett, W. C. (2011). The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010?. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 684-688.
- B**ach, A. G. G., A; Gómez-Cortes, P; Juárez-Iglesias, M., Fuente-Layos, M. A., Rodríguez-Lozano, J. C. (2011). Spain Patent N°. 2 336 065. S. P. a. T. Office.
- Baker, E.J., Miles. E. A., Burdge, G.C., Yaqoob, P., & Calder, P.C. (2016). Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. *Progress in lipid research*, 64:30-56.
- Balogopal, P. B., de Ferranti, S. D., Cook, S., Daniels, S. R., Gidding, S. S., Hayman, L. L., & Steinberger, J. (2011). Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth:

- a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 123(23), 2749-2769.
- Bauman, D. E., Baumgard, L. H., Corl, B. A., & Griinari, J. M. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*.
- Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., & Lock, A. L. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1235-1243.
- Bays, H. E., Ballantyne, C. M., Kastelein, J. J., Isaacsohn, J. L., Braeckman, R. A., & Soni, P. N. (2011). Eicosapentaenoic Acid Ethyl Ester (AMR101) Therapy in Patients With Very High Triglyceride Levels (from the Multi-center, placebo-controlled, Randomized, double-blind, 12-week study with an open-label Extension [MARINE] Trial). *American Journal of Cardiology*, 108(5), 682-690.
- Bellido, D., & Carreira, J. (2008) Análisis por absorciometría de rayos X de doble energía y composición corporal. *Nutrición Clínica en Medicina*, 2:85-108.
- Benatar, J. R. , Jones, E., White, H., & Stewart, R. A. (2014). A randomized trial evaluating the effects of change in dairy food consumption on cardio-metabolic risk factors. *European Journal of Preventive Cardiology*, 21(11):1376-86.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Quality of selected cheeses fortified with vegetable and animal sources of omega-3. *LWT - Food Science and Technology*, 44(7), 1577-1584.
- Boden, G. (2008). Obesity and Free Fatty Acids (FFA). *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 37(3), 635-ix.
- BOE Regulatory Board 256 25, (25 January 2001). Protected Denomination Origin (PDO) 'Queso de Murcia'.
- Bordoni, A., Danesi, F., Dardevet, D., Dupont, D., Fernandez, A. S., Gille, D., & Vergeres, G. (2017). Dairy products and inflammation: A review of the clinical evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2497-2525.
- Branciarì, R., Valiani, A., Trabalza-Marinucci, M., Miraglia, D., Ranucci, D., Acuti, G., & Mugghetti, L. (2012). Consumer acceptability of ovine cheese from ewes fed

extruded linseed-enriched diets. *Small Ruminant Research*, 106, Supplement, S43-S48.

Calvo, M. V., Castro-Gomez, M. P., Fontecha, J., Garcia-Serrano, A. M., Juarez, M., & Rodriguez Alcala, L. M. (2014). Grasa láctea: una fuente natural de compuestos bioactivos. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 21(3), 57-63.

Caravaca, F., Ares, J. L., Carrizosa, J., Urrutia, B., Baena, F., Jordana, J., & Serradilla, J. M. (2011). Effects of alpha s1-casein (CSN1S1) and kappa-casein (CSN3) genotypes on milk coagulation properties in Murciano-Granadina goats. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 32-37.

Caroprese, M., Albenzio, M., Bruno, A., Fedele, V., Santillo, A., & Sevi, A. (2011). Effect of solar radiation and flaxseed supplementation on milk production and fatty acid profile of lactating ewes under high ambient temperature. *Journal of Dairy Science*, 94(8):3856-67.

Caroprese, M., Sevi, A., Marino, R., Santillo, A., Tateo, A., & Albenzio, M. (2013). Composition and textural properties of Mozzarella cheese naturally-enriched in polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Research*, 80(3), 276-282.

Castro, I. A., Monteiro, V. C., Barroso, L. P., & Bertolami, M. C. (2007). Effect of eicosapentaenoic/docosahexaenoic fatty acids and soluble fibers on blood lipids of individuals classified into different levels of lipidemia. *Nutrition*, 23(2):127-37.

Castro-Gomez, M. P., Rodriguez-Alcala, L. M., Calvo, M. V., Romero, J., Mendiola, J. A., Ibanez, E., & Fontecha, J. (2014). Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6719-6728.

Castro-Gomez, M.P. (2015). Mejora de la composición en fosfo- y esfingolípidos de la membrana del glóbulo graso de la leche para su aplicación como ingrediente bioactivo en derivados lácteos funcionales. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Castro-Gomez, P., Fontecha, J., & Rodríguez-Alcalá, L. M. (2014). A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta*, 128, 518-523.

- Castro-Gomez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F., & Fontecha, J. (2015). Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 101, 41-51.
- Castro-Gómez, P., Rodríguez-Alcalá, L.M., Calvo, & Fontecha, J. (2015). "Phospholipids and Sphingolipids in Ewes Milk After Diet Supplementation with Sunflower Oil" in *Proceedings of the Congress: "Euro Food Chemistry XVIII"*. Madrid, Spain.
- Chatterton, D. E., Nguyen, D. N., Bering, S. B., & Sangild, P. T. (2013). Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *International Journal Biochemistry Cell Biology*, 45(8), 1730-1747.
- Chilliard, Y., Ferlay, F., Bernard, B., Rouel, L., & Jacques, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855.
- Chilliard, Y., & Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), 467-492.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., & Lamberet, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1751-1770.
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., & Doreau, M. (2009). Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5199-5211.
- Chilliard, Y., Toral, P. G., Shingfield, K. J., Rouel, J., Leroux, C., & Bernard, L. (2014). Effects of diet and physiological factors on milk fat synthesis, milk fat composition and lipolysis in the goat: A short review. *Small Ruminant Research*, 122(1-3), 31-37.
- Collomb, M., Sieber, R., & Butikofer, U. (2004). CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids*, 39(4), 355-364.
- Commission Regulation (EU) No 116/2010 of 9 February 2010 amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims.

- Conway, V., Couture, P., Gauthier, S., Pouliot, Y., & Lamarche, B. (2014). Effect of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women. *Nutrition*, 30(1), 116-119.
- Corl, B. A., Barbano, D. M., & Bauman, D. E. (2003). Cis-9, trans-11 CLA derived endogenously from trans-11 18:1 reduces cancer risk in rats. *The Journal of Nutrition*, 133(9):2893-900.
- Cortés-Castell, E., Rizo-Baeza, M. M., Aguilar, M., Hidalgo, M., & Gil-Guillén, V. (2013). Relación entre los ácidos grasos en suero y en los fosfolípidos de membrana en niños sanos. *Nutrición Hospitalaria*. 2013;28:1541-5.
- Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Pollonio, M. A. R., Bolini, H. M. A., Celeghini, R. M. S., Granato, D., & Shah, N. P. (2011). Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 276-291
- D**awczynski, C., Massey, K. A., Ness, C., Kiehntopf, M., Stepanow, S., Platzer, M., & Jahreis, G. (2013). Randomized placebo-controlled intervention with n-3 LC-PUFA-supplemented yoghurt: effects on circulating eicosanoids and cardiovascular risk factors. *Clinical Nutrition*, 32(5), 686-696.
- de Goede, J., Geleijnse, J. M., Ding, E. L., & Soedamah-Muthu, S. S. (2015). Effect of cheese consumption on blood lipids: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition Reviews*, 73(5), 259-275.
- de Oliveira Otto, M. C., Nettleton, J. A., Lemaitre, R. N., Steffen, L. M., Kromhout, D., Rich, S. S., & Mozaffarian, D. (2013). Biomarkers of dairy fatty acids and risk of cardiovascular disease in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*, 2(4), 92.
- de Souza, R. J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A. I., Ha, V., Kishibe, T., & Anand, S. S. (2015). Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *British Medical Journal*, 351, h3978.
- Dejenie, A. A., & Adugna, M. (2014). Bioactive Properties of Goat Milk: It's Hypoallergenic, Nutritional and Therapeutic Significance: A Review. *Global Journal of American Scientific Research*, 2(4).
- Desroches, S., Chouinard, P., Galibois, I., Corneau, L., Delisle, J., & Lamarche, B.

- (2005). Lack of effect of dietary conjugated linoleic acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2):309-19.
- Dial, E. J., Doyen, J. R., & Lichtenberger, L. M. (2006). Phosphatidylcholine-associated nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit DNA synthesis and the growth of colon cancer cells in vitro. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 57(3), 295-300.
- Dias, C. B., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2016). Effects of dietary saturated and n-6 polyunsaturated fatty acids on the incorporation of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids into blood lipids. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70(7), 812-818.
- Dittrich, M., Jahreis, G., Bothor, K., Drechsel, C., Kiehntopf, M., & Bluher, M. (2015). Benefits of foods supplemented with vegetable oils rich in alpha-linolenic, stearidonic or docosahexaenoic acid in hypertriglyceridemic subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 54(6):881-93.
- Dragomir, K., & Komprej, A. (2012). The Effect of Fatty Acids in Goat Milk on Health, Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health, Prof. Narongsak Chaiyabutr (Ed.), InTech.
- Drouin-Chartier, J.-P., Brassard, D., Tessier-Grenier, M., Côté, J. A., Labonté, M.-È., Desroches, S., & Lamarche, B. (2016). Systematic Review of the Association between Dairy Product Consumption and Risk of Cardiovascular-Related Clinical Outcomes. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 7(6), 1026-1040.
- E**lwood, P. C., Pickering, J. E., Givens, D. I., & Gallacher, J. E. (2010). The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence. *Lipids*, 45(10), 925-939.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., & et al. (2004). Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: A randomized trial. *Journal of the American Medical Association*, 292(12), 1440-1446.
- F**erreiro, T., Gayoso, L., & Rodriguez-Otero, J. L. (2015). Milk phospholipids: Organic milk and milk rich in conjugated linoleic acid compared with conventional milk. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 9-14.

- Ferreiro, T., Martinez, S., Gayoso, L., & Rodriguez-Otero, J. L. (2016). Evolution of phospholipid contents during the production of quark cheese from buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4154-4159.
- Field, C. J., Blewett, H. H., Proctor, S., & Vine, D. (2009). Human health benefits of vaccenic acid. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 34(5), 979-991.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1):497-509.
- Fontecha, F. J., Rodriguez-Alcala, L. M., Calvo, M. V., & Juarez, M. (2011). Bioactive Milk Lipids. *Current Nutrition and Food Science*, 7, 155-159.
- Fontecha, J., & Juarez-Iglesias, M. (2012) Avances científicos sobre el papel de la grasa láctea en la alimentación. *Avances en Alimentación, Nutrición y Dietética*, Editorial Nemira, Madrid, España. 2012 p. 117-134. ISBN 9788494015298.
- Fontecha, J., Díaz, V., Fraga, M. J., & Juárez, M. (1998). Triglyceride analysis by gas chromatography in assessment of authenticity of goat milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), 1893-1896.
- Fontecha, J., Goudjil, H., Ríos, J. J., Fraga, M. J., & Juárez, M. (2005). Identity of the major triacylglycerols in ovine milk fat. *International Dairy Journal*, 15(12), 1217-1224.
- Fontecha, J., Ríos, J. J., Lozada, L., Fraga, M. J., & Juárez, M. (2000). Composition of goat's milk fat triglycerides analysed by silver ion adsorption-TLC and GC-MS. *International Dairy Journal*, 10(1-2), 119-128.
- G**arcia-Alonso, F. J., Jorge-Vidal, V., Ros, G., & Periago, M. J. (2012). Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. *European Journal of Nutrition*, 51(4), 415-424.
- Gassi, J.-Y., Thève, M., Beaucher, E., Camier, B., Maillard, M.-B., Rousseau, F., & Lopez, C. (2012). Soft goats' cheese enriched with polyunsaturated fatty acids by dietary supplementation: manufacture, physicochemical and sensory characterisation. *Dairy Science & Technology*, 92(5), 569-591.



- Gastaldi, D., Medana, C., Giancotti, V., Aigotti, R., Dal Bello, F., & Baiocchi, C. (2011). HPLC-APCI analysis of triacylglycerols in milk fat from different sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(2), 197-207.
- Gayet-Boyer, C. (2011). Ruminant trans fatty acids intake and cardiovascular risk factors: A quantitative review of intervention studies. *IDF World Dairy Summit*.
- German, J. B., Gibson, R. A., Krauss, R. M., Nestel, P., Lamarche, B., van Staveren, W. A., & Destallats, F. (2009). A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition*, 48(4), 191-203.
- Giger-Reverdin, S., Rigalma, K., Desnoyers, M., Sauvant, D., & Duvaux-Ponter, C. (2014). Effect of concentrate level on feeding behavior and rumen and blood parameters in dairy goats: relationships between behavioral and physiological parameters and effect of between-animal variability. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4367-4378.
- Gijon-Conde, T., Graciani, A., Guallar-Castillon, P., Aguilera, M. T., Rodriguez-Artalejo, F., & Banegas, J. R. (2015). Leptin Reference Values and Cutoffs for Identifying Cardiometabolic Abnormalities in the Spanish Population. *Revista Española de Cardiología (Engl Ed)*, 68(8), 672-679.
- Glasser, F., Doreau, M., Ferlay, A., & Chilliard, Y. (2007). Technical note: Estimation of milk fatty acid yield from milk fat data. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2302-2304.
- Gomez-Cortes, P. 2009. Efecto de la suplementación de la dieta ovina con distintas fuentes lipídicas sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. *Universidad Autónoma de Madrid, Madrid*.
- Gomez-Cortes, P., Bach, A., Luna, P., Juarez, M., & de la Fuente, M. A. (2009). Effects of extruded linseed supplementation on n-3 fatty acids and conjugated linoleic acid in milk and cheese from ewes. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4122-4134.
- Gomez-Cortes, P., de la Fuente, M. A., Toral, P. G., Frutos, P., Juarez, M., & Hervás, G. (2011). Effects of different forage:concentrate ratios in dairy ewe diets supplemented with sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4578-4588.
- Gomez-Cortes, P., Viturro, E., Juarez, M., & de la Fuente, M. A. (2015). Alternative to decrease cholesterol in sheep milk cheeses. *Food Chemistry*, 188, 325-327.

- Goudjil, H., Fontecha, J., Fraga, M. J., & Juárez, M. (2003). TAG composition of ewe's milk fat. Detection of foreign fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(3), 219-222.
- Goudjil, H., Torrado, S., Fontecha, J., Martínez-Castro, I., Fraga, M. J., & Juárez, M. (2003). Composition of cholesterol and its precursors in ovine milk. *Lait*, 83(2), 153-160.
- Griinari, J. M., Dwyer, D. A., McGuire, M. A., Bauman, D. E., Palmquist, D. L., & Nurmela, K. V. (1998). Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1251-1261.
- Guinee, T. P., & Kilcawley, K. N. (2010). Cheesemaking processes and strategies for manufacture of low fat and reduced sodium cheeses. *Journal of Dairy Science*. 93(E-Suppl. 1):265–266. (Abstr.)
- Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155-163.
- Harris, W. S., Masson, S., Barlera, S., Milani, V., Pileggi, S., & Franzosi, M.G. (2016). Red blood cell oleic acid levels reflect olive oil intake while omega-3 levels reflect fish intake and the use of omega-3 acid ethyl esters: The Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-Heart Failure trial. *Nutrition Research*, 36(9):989-94.
- Hess, J. M., Jonnalagadda, S. S., & Slavin, J. L. (2016). Dairy Foods: Current Evidence of their Effects on Bone, Cardiometabolic, Cognitive, and Digestive Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 251-268.
- Hilmarsson, H., Larusson, L. V., & Thornar, H. (2006). Virucidal effect of lipids on visna virus, a lentivirus related to HIV. *Archives of Virology* 151, 1217-24.
- Hjerpsted, J., & Tholstrup, T. (2016). Cheese and Cardiovascular Disease Risk: A Review of the Evidence and Discussion of Possible Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1389-1403.
- Hodson, L., Skeaff, C. M., & Fielding, B. A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research*, 47(5), 348-380.
- Holcapek, M., Cervena, B., Cifkova, E., Lisa, M., Chagovets, V., & Vostalova, J. (2015). Lipidomic analysis of plasma, erythrocytes and lipoprotein fractions of

cardiovascular disease patients using UHPLC/MS, MALDI-MS and multivariate data analysis. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 990:52-63.

Hooper, L., Martin, N., Abdelhamid, A., Davey, G. (2015). Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, (6):Cd011737.

Houston, D. K., Driver, K. E., Bush, A. J., & Kritchevsky, S. B. (2008). The association between cheese consumption and cardiovascular risk factors among adults. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 21(2), 129-140.

Howe, P., Buckley, J., Murphy, K., Pettman, T., Milte, C., & Coates, A. (2014). Relationship between erythrocyte omega-3 content and obesity is gender dependent. *Nutrients*, 6(5):1850-60.

Hunter, D. J., & Reddy, K. S. (2013). *Noncommunicable Diseases*. *New England Journal of Medicine*, 369(14), 1336-1343.

Huxley, R., Lewington, S., & Clarke, R. (2002). Cholesterol, coronary heart disease and stroke: a review of published evidence from observational studies and randomized controlled trials. *Seminars in Vascular Medicine*, 2(3), 315-323.

Informe del consumo de alimentación en España de acuerdo al panel de consumo alimentario del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA).(2017). [http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeannualconsumo2016\\_tcm7-455729.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeannualconsumo2016_tcm7-455729.pdf)

Intorre, F., Foddai, M., Azzini, E., Martin, B., Montel, M., & Catasta, G. (2011). Differential effect of cheese fatty acid composition on blood lipid profile and redox status in normolipidemic volunteers: a pilot study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(6):660-9.

Intorre, F., Venneria, E., Finotti, E., Foddai, M. S., Toti, E., Catasta, G., & Maiani, G. (2013). Fatty acid content of serum lipid fractions and blood lipids in normolipidaemic volunteers fed two types of cheese having different fat compositions: a pilot study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(2), 185-193.

ISO (International Organization for Standardization). (2008). Sensory analysis-Methodology. Triangle test general guide. ISO 6658-2005. Geneva, Switzerland.

ISO-IDF (International Organisation for Standardisation). (2002). Milk Fat-Preparation of Fatty Acid Methyl Esters. ISO 15884-IDF 182:2002. ISO. Geneva, Switzerland.

Jäger, R., Purpura, M., & Kingsley, M. (2007). Phospholipids and sports performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 4(1), 5.

Jenkins, B., West, J., & Koulman, A. (2015). A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic Acid (c15:0) and heptadecanoic Acid (c17:0) in health and disease. *Molecules*, 20(2):2425-44.

Jenness, R. (1980). Composition and Characteristics of Goat Milk: Review 1968-1979. *Journal of Dairy Science*, 63(10), 1605-1630.

Jones, E. L., Shingfield, K. J., Kohen, C., Jones, A. K., Lupoli, B., Grandison, A. S., & Yaqoob, P. (2005). Chemical, Physical, and Sensory Properties of Dairy Products Enriched with Conjugated Linoleic Acid. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2923-2937.

Joseph, S., Jacques, H., Plourde, M., Mitchell, P., McLeod, R., & Jones, P. (2011). Conjugated linoleic acid supplementation for 8 weeks does not affect body composition, lipid profile, or safety biomarkers in overweight, hyperlipidemic men. *The Journal of Nutrition*, 141(7):1286-91.

Juarez-Iglesias, M., de la Fuente Layos, M.A., & Fontecha, J. (2015). Los nutrientes de la leche en la salud cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, 31 (Supl. 2), 26-32.

Jutzeler van Wijlen, R. P., & Colombani, P. C. (2010). Grass-based ruminant production methods and human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of conjugated linoleic acids. *International Dairy Journal*, 20(7), 433-448.

Kastelein, J. J., Maki, K. C., Susekov, A., Ezhov, M., Nordestgaard, B. G., Machielse, B. N., & Davidson, M. H. (2014). Omega-3 free fatty acids for the treatment of severe hypertriglyceridemia: the EpanoVa fOr Lowering Very high triglyceridEs (EVOLVE) trial. *Journal of Clinical Lipidology*, 8(1), 94-106.

Khandelwal, S., Demonty, I., Jeemon, P., Lakshmy, R., Mukherjee, R., Gupta, R., & Reddy, K. S. (2009). Independent and interactive effects of plant sterols and fish oil n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the plasma lipid profile of mildly hyperlipidaemic Indian adults. *British Journal of Nutrition*, 102(5), 722-732.

- Kim, B., Lim, H. R., Lee, H., Lee, H., Kang, W., & Kim, E. (2016). The effects of conjugated linoleic acid (CLA) on metabolic syndrome patients: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Functional Foods*, 25, 588-598.
- Kingsley, M., Wadsworth, D., Kilduff, L. P., McEneny, J., & Benton, D. (2005). Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent running. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 37.
- Klok, M. D., Jakobsdottir, S., & Drent, M. L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, 8(1), 21-34.
- Klop, B., Proctor, S. D., Mamo, J. C., Botham, K. M., & Castro Cabezas, M. (2012). Understanding postprandial inflammation and its relationship to lifestyle behaviour and metabolic diseases. *International Journal of Vascular Medicine*, 947 (4-17).
- Labonte, M. E., Couture, P., Richard, C., Desroches, S., & Lamarche, B. (2013). Impact of dairy products on biomarkers of inflammation: a systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(4), 706-717.
- Labonte, M. E., Cyr, A., Abdullah, M. M., Lepine, M. C., Vohl, M. C., Jones, P., & Lamarche, B. (2014). Dairy product consumption has no impact on biomarkers of inflammation among men and women with low-grade systemic inflammation. *Journal of Nutrition*, 144(11), 1760-1767.
- Laso, N., Brugue, E., Vidal, J., Ros, E., Arnaiz, J. A., Carne, X., Lafuente, A. (2007). Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid (isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12) on body composition and metabolic syndrome components. *British Journal of Nutrition*, 98(4), 860-867.
- Legrand, P., Schmitt, B., Mourot, J., Catheline, D., Chesneau, G., Mireaux, M., & Weill, P. (2010). The consumption of food products from linseed-fed animals maintains erythrocyte omega-3 fatty acids in obese humans. *Lipids*, 45(1), 11-19.
- Lichtenstein, A. H., Erkkila, A. T., Lamarche, B., Schwab, U. S., Jalbert, S. M. & Ausman, L. M. (2003). Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis*, 171, 97-107.

- Lobos Bejarano, J. M., & Brotons Cuixart, C. (2011). Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. *Atención Primaria*, 43(12), 668-677.
- Lock, A. L., Corl, B. A., Barbano, D. M., Bauman, D. E., & Ip, C. (2004). The anticarcinogenic effect of trans-11 18:1 is dependent on its conversion to cis-9, trans-11 CLA by delta9-desaturase in rats. *Journal of Nutrition*, 134(10), 2698-2704.
- López Gómez, J. J., Pérez Castrillón, J. L., Romero Bobillo, E., & Luis Román, D. A. d. (2016). Efecto del tratamiento dietoterápico de la obesidad sobre el metabolismo óseo. *Nutricion Hospitalaria*, 33, 1452-1460.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., & Besle, J. M. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5226-5236.
- Lopez, C., Cauty, C., & Guyomarc'h, F. (2015). Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 863-893.
- Lovegrove, J. A., & Hobbs, D. A. (2016). New perspectives on dairy and cardiovascular health. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 75(3), 247-258.
- Luna, P. 2006. Ácido linoleico conjugado en productos lácteos. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Luna, P., Bach, A., de la Fuente, M. A. & Juárez, M. (2008a). Influence of diets rich in flax seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. *International Dairy Journal*, 18(1), 99-107.
- Luna, P., Bach, A., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2008b). Effect of a diet enriched in whole linseed and sunflower oil on goat milk fatty acid composition and conjugated linoleic acid isomer profile. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 20-28.
- Luna, P., Fontecha, J., Juárez, M., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2005). Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids* 40. 445–454.

Luna, P., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2005). Validation of a Rapid Milk Fat Separation Method to Determine the Fatty Acid Profile by Gas Chromatography. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3377-3381.

Luna, P., Rodríguez-Pino, V., & de la Fuente, M. A. (2009). Occurrence of C16:1 isomers in milk fats from ewes fed with different dietary lipid supplements. *Food Chemistry*, 117(2), 248-253.

Maddock, T. D., Bauer, M. L., Koch, K. B., Anderson, V. L., Maddock, R. J., Barcelo-Coblijn, G., & Lardy, G. P. (2006). Effect of processing flax in beef feedlot diets on performance, carcass characteristics, and trained sensory panel ratings. *Journal of Animal Science*, 84(6), 1544-1551.

MAPAMA (2015). Caracterización del sector ovino y caprino en España año 2015. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, España.

Marcovina, S., & Packard, C. J. (2006). Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *Journal of Internal Medicine*, 259(5), 437-446.

Marrone, R., Balestrieri, A., Pepe, T., Vollano, L., Murru, N., D'Occhio, M. J., & Anastasio, A. (2014). Physicochemical composition, fatty acid profile and cholesterol content of "Pecorino Carmasciano" cheese, a traditional Italian dairy product. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1–2), 85-89.

Marrugat, J., Solanas, P., D'Agostino, R., Sullivan, L., Ordovas, J., Cerdón, F., & Kannel, W. B. (2003). Estimación del riesgo coronario en España mediante la ecuación de Framingham calibrada. *Revista Española de Cardiología*, 56(03), 253-261.

Martín Lorenzo, M. (2015). Estudio proteómico y metabolómico de la enfermedad cardiovascular en la búsqueda de nuevos biomarcadores. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Martinez Marin, A. L., Gomez-Cortes, P., Gomez Castro, A. G., Juarez, M., Perez Alba, L. M., Perez Hernandez, M., & de la Fuente, M. A. (2011). Animal performance and milk fatty acid profile of dairy goats fed diets with different unsaturated plant oils. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5359-5368.

Martinez Marin, A. L., Gomez-Cortes, P., Gomez Castro, G., Juarez, M., Perez Alba, L., Perez Hernandez, M., & de la Fuente, M. A. (2012). Effects of feeding increasing

- dietary levels of high oleic or regular sunflower or linseed oil on fatty acid profile of goat milk. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1942-1955.
- Mateos-Cáceres, P. J. (2009). Marcadores sanguíneos utilizados en el diagnóstico y pronóstico del riesgo cardiovascular. In F. BBVA (Ed.). *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y Fundación BBVA*.
- McCrorie, T. A., Keaveney, E. M., Wallace, J. M., Binns, N., & Livingstone, M. B. (2011). Human health effects of conjugated linoleic acid from milk and supplements. *Nutrition Research Reviews*, 24(2), 206-227.
- Medeiros, E., Queiroga, R., Medeiros., Bomfim., Batista., Félex., & Madruga, M. S. (2013). Sensory profile and physicochemical parameters of cheese from dairy goats fed vegetable oils in the semiarid region of Brazil. *Small Ruminant Research*, 113(1), 211-218.
- Medeiros, E., Queiroga, R., Oliveira, M., Medeiros, A., Sabedot, M., Bomfim, M., & Madruga, M. (2014). Fatty acid profile of cheese from dairy goats fed a diet enriched with castor, sesame and faveleira vegetable oils. *Molecules*, 19(1), 992-1003.
- Mele, M., Contarini, G., Cercaci, L., Serra, A., Buccioni, A., Povo, M., & Secchiari, P. (2011). Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: Effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. *International Dairy Journal*, 21(5), 365-372.
- Mele, M., Dal Zotto, R., Cassandro, M., Conte, G., Serra, A., Buccioni, A., & Secchiari, P. (2009). Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 392-400.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M. & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1146.
- Mente, A., de Koning, L., Shannon, H.S., & Anand, S. S. (2009). A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Archives of Internal Medicine*, 169(7):659-69.
- Mika, A., & Sledzinski, T. (2017) Alterations of specific lipid groups in serum of obese humans: a review. *Obesity Reviews*, 18: 247–272.



- Miles, E. A., Banerjee, T., Wells, S. J., & Calder, P. C. (2006). Limited effect of eicosapentaenoic acid on T-lymphocyte and natural killer cell numbers and functions in healthy young males. *Nutrition*, 22(5), 512-519.
- Millán, J., Pintó, X., Muñoz, A., Zúñiga, M., Rubiés-Prat, J., Pallardo, L.F., Masana, L., Mangas, A., Hernández-Mijares, A., González-Santos, P., Ascaso, J. F., Botet, J. P. (2010). Cocientes lipoproteicos: significado fisiológico y utilidad clínica de los índices aterogénicos en prevención cardiovascular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 22(1):25-32.
- Montagnese, C., Santarpia, L., Buonifacio, M., Nardelli, A., Caldara, A. R., & Silvestri, E. (2015). European food-based dietary guidelines: A comparison and update. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif). 31(7–8):908-15.
- Morales, P. J., Valenzuela, B. R., González, M. D., González, E. M., & Tapia, O, G. (2012). Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Revista Chilena de Nutrición*, 39:79-87.
- Mozaffarian, D., Micha, R., & Wallace, S. (2010). Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS medicine*, 7(3).
- Mozaffarian, D. (2014). Saturated fatty acids and type 2 diabetes: more evidence to reinvent dietary guidelines. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(10):770-2.
- Murphy, K. J., Meyer, B. J., Mori, T. A., Burke, V., Mansour, J., Patch, C. S., & Howe, P. R. (2007). Impact of foods enriched with n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on erythrocyte n-3 levels and cardiovascular risk factors. *The British Journal of Nutrition*, 97(4), 749-757.
- Mwenze, P. M. (2015). Functional Properties of Goats' Milk: A Review. *Research Journal of Agriculture and Environmental Management*, 4(9), 343-349.
- N** Nakamura, M.T., & Nara, T.Y. (2004). Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annual Review of Nutrition*, (24) 345-76.
- Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C., Ruiz-Lopez, M. D., Olalla, M., Artacho, R., Gimenez, R., & Bergillos, T. (2011). Levels of Se, Zn, Mg and Ca in commercial

goat and cow milk fermented products: Relationship with their chemical composition and probiotic starter culture. *Food Chemistry*, 129(3), 1126-1131.

Nestel, P. (2014). Trans fatty acids: are its cardiovascular risks fully appreciated? *Clinical Therapeutics*, 36(3):315-21.

Nestel, P. J., Mellett, N., Pally, S., Wong, G., Barlow, C. K., Croft, K., & Meikle, P. J. (2013). Effects of low-fat or full-fat fermented and non-fermented dairy foods on selected cardiovascular biomarkers in overweight adults. *The British Journal of Nutrition*, 110(12), 2242-2249.

Nicolosi, R. J., Rogers, E. J., Kritchevsky, D., Scimeca, J. A., & Huth, P. J. (1997). Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*, 22(5):266-77.

Nilsen, R., Hostmark, A. T., Haug, A., & Skeie, S. (2015). Effect of a high intake of cheese on cholesterol and metabolic syndrome: results of a randomized trial. *Food Nutrition Research*, 59, 276-51.

Nudda, A., Battacone, G., Usai, M. G., Fancellu, S., & Pulina, G. (2006). Supplementation with extruded linseed cake affects concentrations of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 277-282.

Nutrition EPoDP, Allergies. (2010). Scientific Opinion on establishing Food-Based Dietary Guidelines. *EFSA Journal*, 8(3).

**O**bregón, O., Gestne, A., Lares, M., Castro, J., Stulin, I., Rivas, K., Aponte, A., & Martínez, J. (2010). Estatinas y factor de necrosis tumoral alfa. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 5() 6-10.

Ordovás, J. M. (2009). Integración del medio ambiente y la enfermedad en el análisis «ómico». *Revista Española de Cardiología*, 62(Supl.2), 17-22.

**P**annu, P. K., Calton, E. K., & Soares, M. J. (2016). Calcium and Vitamin D in Obesity and Related Chronic Disease. *Advances in Food and Nutrition Research*, 77, 57-100.

Park, Y. W. (2013). Effect of 5 years long-term frozen storage on sensory quality of Monterey Jack caprine milk cheese. *Small Ruminant Research*, 109(2-3), 136-140.

- Park, Y. W., Lee, J. H., & Lee, S. J. (2006). Effects of frozen and refrigerated storage on organic acid profiles of goat milk plain soft and Monterey Jack cheeses. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 862-871.
- Parodi, P. W. (2009). Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized?. *International Dairy Journal*, 19(6–7), 345-361.
- Parodi, P.W. (2009). Milk lipids: Their role as potential anti-cancer agents. *Sciences des Aliments*, 28:44-52.
- Pearson, T. A., Palaniappan, L. P., Artinian, N. T., Carnethon, M. R., Criqui, M. H., Daniels, S. R., & Turner, M. B. (2013). American Heart Association Guide for Improving Cardiovascular Health at the Community Level, 2013 Update. A Scientific Statement for Public Health Practitioners, Healthcare Providers, and Health Policy Makers.
- Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Z., Verschuren, M., Zannad, F. (2012). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *European Heart Journal*, 33(13), 1635-1701.
- Petrogianni, M., Grammatikaki, E., Kalogeropoulos, N., Peristeraki, A., Moschonis, G., & Pitsavos, C. (2014). Additional benefit in CVD risk indices derived from the consumption of fortified milk when combined with a lifestyle intervention. *Public Health Nutrition*, 17(2):440-9.
- Pintus, S., Murru, E., Carta, G., Cordeddu, L., Batetta, B., Accossu, S., & Banni, S. (2013). Sheep cheese naturally enriched in alpha-linolenic, conjugated linoleic and vaccenic acids improves the lipid profile and reduces anandamide in the plasma of hypercholesterolaemic subjects. *The British Journal of Nutrition*, 109(8), 1453-1462.
- Pipero, L. S., Sampugna, J., Teter, B. B., Kalscheur, K. F., Yurawecz, M. P., Ku, Y., & Erdman, R. A. (2002). Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 132(6), 1235-1241.

- Prabhakaran, D., Jeemon, P., & Roy, A. (2016). Cardiovascular Diseases in India: Current Epidemiology and Future Directions. *Circulation*, 133(16), 1605-1620.
- Pralhada Rao, R., Vaidyanathan, N., Rengasamy, M., Mammen Oommen, A., Somaiya, N., & Jagannath, M. R. (2013). Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *Journal of Lipids*, 2013, 178-910.
- Ramírez Alvarado, M.<sup>a</sup> M., & Sánchez Roitz, C.. (2012). El factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1751-1757.
- Ratnayake, W. M. (2015). Concerns about the use of 15:0, 17:0, and trans-16:1n-7 as biomarkers of dairy fat intake in recent observational studies that suggest beneficial effects of dairy food on incidence of diabetes and stroke. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(5), 1102-1103.
- Regulation (EC) N° 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods.
- Reklewska, B., Oprządek, A., Reklewski, Z., Panicke, L., Kuczyńska, B., & Oprządek, J. (2002). Alternative for modifying the fatty acid composition and decreasing the cholesterol level in the milk of cows. *Livestock Production Science*, 76(3), 235-243.
- Rice, B. H. (2014). Dairy and Cardiovascular Disease: A Review of Recent Observational Research. *Current Nutrition Reports*, 3(2), 130–138.
- Ridker, P. M. (2004). High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *The American Heart Journal*, 148(1 Suppl), S19-26.
- Robinson, J. G., & Stone, N. J. (2006). Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *The American Journal of Cardiology*, 98(4a), 39i-49i.
- Rodríguez-Alcalá, L.M. (2009). Lípidos bioactivos en productos lácteos: estrategias para su incremento y efectos del procesado y la conservación. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Rombaut, R., Camp, J. V., & Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(4), 435-443.
- Ruiz-Fernández, N., Espinoza-Zavala, M., González, J. C., Leal-Herrera, U., & Reigosa-Yaniz, A. (2011). LDL oxidada circulante y anticuerpos contra LDL oxidada

según niveles de ácido úrico en mujeres con exceso de peso. *Archivos de Cardiología de México*, 81(3), 188-196.

Rulikowska, A., Kilcawley, K. N., Doolan, I. A., Alonso-Gomez, M., Nongonierma, A. B., Hannon, J. A., & Wilkinson, M. G. (2013). The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality. *International Dairy Journal*, 28(2), 45-55.

**S**alas-Salvado, J., Marquez-Sandoval, F., & Bullo, M. (2006). Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Critical Reviews of Food Science & Nutrition*, 46(6):479-88.

Salas-Salvadó, J., Rubio, M. A., Barbany, M., Moreno, B., & de la Siedo\*, G. C. (2007). Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Medicina Clínica*, 128(5), 184-196.

Samsell, L., Regier, M., Walton, C., & Cottrell, L. (2014). Importance of Android/Gynoid Fat Ratio in Predicting Metabolic and Cardiovascular Disease Risk in Normal Weight as well as Overweight and Obese Children. *Journal of Obesity*, (8)465-78.

Sánchez, F. M., Albo Castaño, M. I., Casallo Blanco, S., Vizuet Calero, A., & Matías Salces, L. d. (2008). Importancia de las apoproteínas A1 y B como marcadores de riesgo cardiovascular. *Anales de Medicina Interna*, 25, 199-200.

Sander, M., Becker, S., Thiery, J., & Ceglarek, U. (2015). Simultaneous Identification and Quantification of Triacylglycerol Species in Human Plasma by Flow-Injection Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*, 78(5):435-43.

Sands, S. A., Reid, K. J., Windsor, S. L., & Harris, W. S. (2005). The impact of age, body mass index, and fish intake on the EPA and DHA content of human erythrocytes. *Lipids*, 40(4):343.

Santurino, C., Calvo, M. V., Gómez-Candela, C., & Fontecha, J. (2017). Characterization of naturally goat cheese enriched in conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acids for human clinical trial in overweight and obese subjects. *PharmaNutrition*, 5(1):8-17.

- Sanz-Sampelayo, M. R., Chilliard, Y., Schmidely, P., & Boza, J. (2007). Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 42-63.
- Schmid, A., Petry, N., Walther, B., Butikofer, U., Luginbuhl, W., Gille, D., & Vergeres, G. (2015). Inflammatory and metabolic responses to high-fat meals with and without dairy products in men. *The British Journal of Nutrition*, 113(12), 1853-1861.
- Schuchardt, J. P., Neubronner, J., Block, R. C., von Schacky, C., & Hahn, A. (2014). Associations between Omega-3 Index increase and triacylglyceride decrease in subjects with hypertriglyceridemia in response to six month of EPA and DHA supplementation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 91(4), 129-134.
- Shaikh, N. A., Yantha, J., Shaikh, S., Rowe, W., Laidlaw, M., Cockerline, C., & Jackowski, G. (2014). Efficacy of a unique omega-3 formulation on the correction of nutritional deficiency and its effects on cardiovascular disease risk factors in a randomized controlled VASCAZEN((R)) REVEAL Trial. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 396(1-2), 9-22.
- Simopoulos, A. P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8(3):128.
- Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2–3), 154-163.
- Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B., & Krauss, R. M. (2010). Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(3), 502-509.
- Skulas-Ray, A. C., Flock, M. R., Richter, C.K., Harris, W.S., & West, S.G. (2015). Red Blood Cell Docosapentaenoic Acid (DPA n-3) is Inversely Associated with Triglycerides and C-reactive Protein (CRP) in Healthy Adults and Dose-Dependently Increases Following n-3 Fatty Acid Supplementation. *Nutrients*, 7(8):6390-404.
- Smiddy, M. A., Huppertz, T., & van Ruth, S. M. (2012). Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species. *International Dairy Journal*, 24(2), 64-69.
- Sneddon, A. A., Tsofliou, F., Fyfe, C. L., Matheson, I., Jackson, D. M., & Horgan G (2008). Effect of a Conjugated Linoleic Acid and  $\omega$ -3 Fatty Acid Mixture on Body Composition and Adiponectin. *Obesity*, 16(5):1019-24.

- Soedamah-Muthu, S. S., Ding, E. L., Al-Delaimy, W. K., Hu, F. B., Engberink, M. F., Willett, W. C., & Geleijnse, J. M. (2011). Milk and dairy consumption and incidence of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 158-171.
- Sofi, F., Buccioni, A., Cesari, F., Gori, A. M., Minieri, S., Mannini, L., & Antongiovanni, M. (2010). Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and haemorheological variables: a dietary intervention study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*, 20(2), 117-124.
- Sprong, R. C., Hulstein, M. F. E., & Van der Meer, R. (2001). Bactericidal Activities of Milk Lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(4):1298-1301.
- Stone, N. J., Robinson, J. G., Lichtenstein, A. H., Bairey Merz, C. N., Blum, C. B., Eckel, R. H., & Wilson, P. W. (2014). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(25 Pt B), 2889-2934.
- Sun, Q., Ma, J., Campos, H., Hu, F.B. (2007). Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(4):929-37.
- Szajewska, H., & Szajewski, T. (2016). Saturated Fat Controversy: Importance of Systematic Reviews and Meta-analyses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:12, 1947-1951.
- Tolentino, R. , León, S. , Pérez, M. , Herrera, M. , Ayala, A. , González, J. , Bermúdez, B. , Salinas, R. , Francisca, M., & Martínez, J. (2015) Composition of Triacylglycerols in Fats of Cow and Goat Milk Produced in Four Zones of Mexico. *Food and Nutrition Sciences*, 6, 555-561.
- Toral, P. G., Frutos, P., Bichi, E., Hervás, G., & Lopez, S. (2009). Como aumentar el contenido en CLA de la leche de los rumiantes. *Asis Veterinaria*. <http://hdl.handle.net/10261/17159>
- Tricon, S., Burdge, G. C., Jones, E. L., Russell, J. J., El-Khazen, S., & Moretti, E. (2006). et al. Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11

conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(4):744-53.

Tunick, M. H., & Van Hekken, D. L. (2015). Dairy Products and Health: Recent Insights. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63(43), 9381-9388.

Turpeinen, A. M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D. L., & Griinari, J. M. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 504-510.

**V**an Linschoten, R., van Middelkoop, M., Berger, M. Y., Heintjes, E. M., Verhaar, J. A., Willemsen, S. P., & Bierma-Zeinstra, S. M. (2009). Supervised exercise therapy versus usual care for patellofemoral pain syndrome: an open label randomised controlled trial. *BMJ*, 339, b4074.

Venkatramanan, S., Joseph, S. V., Chouinard, P. Y., Jacques, H., Farnworth, E. R., & Jones, P. J. (2010). Milk enriched with conjugated linoleic acid fails to alter blood lipids or body composition in moderately overweight, borderline hyperlipidemic individuals. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(2):152-9.

Visioli, F., & Strata, A. (2014). Milk, Dairy Products, and Their Functional Effects in Humans: A Narrative Review of Recent Evidence. *Advances in Nutrition*, 5(2), 131-143.

Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Dewhurst, R. J. (2006). Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3), 389-417.

Vlaeminck, B., Fievez, V., Tamminga, S., Dewhurst, R. J., van Vuuren, A., De Brabander, D., & Demeyer, D. (2006). Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3954-3964.

**W**arensjo, E., Jansson, J. H., Cederholm, T., Boman, K., Eliasson, M., Hallmans, G., & Sjogren, P. (2010). Biomarkers of milk fat and the risk of myocardial infarction in men and women: a prospective, matched case-control study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(1), 194-202.

Wat, E., Tandy, S., Kapera, E., Kamili, A., Chung, R. W., Brown, A., Cohn, J. S. (2009). Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis*, 205(1), 144-150.



Weir, J. M., Wong, G., Barlow, C. K., Greeve, M. A., Kowalczyk, A., & Almasy, L. (2013). Plasma lipid profiling in a large population-based cohort. *Journal of Lipid Research*, 54(10):2898-908.

**Y**ang, B., Chen, H., Stanton, C., Ross, R. P., & Zhang, H. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15:314-25.

Yanguilar, F. (2013). As a Potentially Functional Food: Goats Milk and Products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(4), 68-81.

Yerlikaya, O., Acu, M., & Kinik, O. (2013). Importance of dairy products in cardiovascular diseases and type 2 diabetes. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 53(9), 902-908.

**Z**eisel, S. H. (2004). Nutritional importance of choline for brain development. *The Journal of the American College of Nutrition*, 23(6 Suppl), 621s-626s.